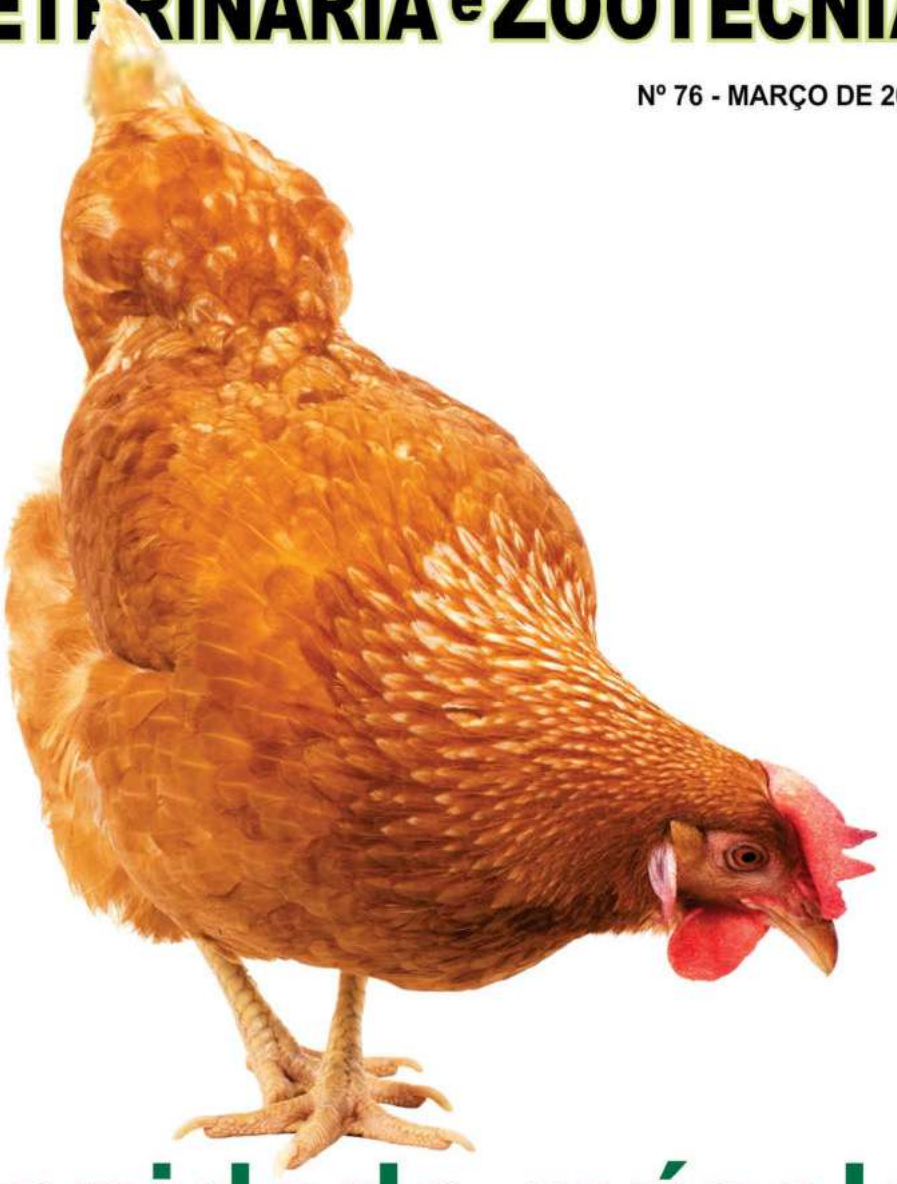
Cadernos Técnicos de

ISSN 1676-6024

VETERINÁRIA e ZOOTECNIA

Nº 76 - MARÇO DE 2015



Sanidade avícola

Escola de Veterinária
UFMG

Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia
FEPMVZ Editora

Conselho Regional de Medicina Veterinária do Estado de Minas Gerais
CRMV-MG

Conselho Regional de Medicina Veterinária do Estado de Minas Gerais

PROJETO DE EDUCAÇÃO CONTINUADA

É o CRMV-MG participando do processo de atualização técnica dos profissionais e levando informações da melhor qualidade a todos os colegas.

VALORIZAÇÃO PROFISSIONAL

compromisso com você

www.crmvmg.org.br

Editorial

Caros colegas,

A Escola de Veterinária e o Conselho Regional de Medicina Veterinária de Minas Gerais têm a satisfação de encaminhar à comunidade veterinária e zootécnica mineira um volume dos Cadernos Técnicos inteiramente destinados à Sanidade Avícola. Este primeiro fascículo de 2015 consolida a parceria e o compromisso entre as duas instituições com relação à Educação Continuada da comunidade dos médicos veterinários e zootecnistas de Minas Gerais. O presente número aborda objetivamente os principais temas em Sanidade Avícola, discorrendo sobre pontos relevantes das principais doenças de notificação obrigatória. A cadeia produtiva de aves industriais absorve a mão de obra veterinária e zootecnista e, principalmente, envolve as espécies *Gallus gallus domesticus* (frango de corte e galinha) e *Meleagris gallopavo* (peru) em Minas Gerais. Segundo o relatório da UBABEF de 2014, o estado cresceu no agronegócio avícola e representa a segunda maior produção nacional (12,37%) de ovos de consumo (segunda posição em exportação), a quinta posição (7,56%) na produção de carne de frango (quarta posição em exportação) e a terceira posição (17,64%) no abate de perus (quarta em exportação). Deseja-se que este volume exerça uma contribuição contínua como um manual de consulta na rotina profissional na área de sanidade avícola. Como colaboradores neste empreendimento, ficamos honrados com a tarefa e orgulhosos do produto final.

Prof. Nelson Rodrigo da Silva Martins - CRMV-MG 4809
Editor dos Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia
Prof. Renato de Lima Santos - CRMV-MG 4577
Diretor da Escola de Veterinária da UFMG
Prof. Antonio de Pinho Marques Junior - CRMV-MG 0918
Editor-Chefe do Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (ABMVZ)
Prof. Nivaldo da Silva - CRMV-MG 0747
Presidente do CRMV-MG

Universidade Federal de Minas Gerais

Escola de Veterinária
Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia - FEPMVZ Editora

Conselho Regional de Medicina Veterinária do Estado de Minas Gerais - CRMV-MG

www.vet.ufmg.br/editora

Correspondência:

FEPMVZ Editora
Caixa Postal 567
30161-970 - Belo Horizonte - MG
Telefone: (31) 3409-2042

E-mail:
editora.vet.ufmg@gmail.com

Conselho Regional de Medicina Veterinária do Estado de Minas Gerais - CRMV-MG

Presidente:

Prof. Nivaldo da Silva

E-mail: crmvmg@crmvmg.org.br

CADERNOS TÉCNICOS DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Edição da FEPMVZ Editora em convênio com o CRMV-MG

Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia - FEPMVZ

Editor da FEPMVZ Editora:

Prof. Antônio de Pinho Marques Junior

Editor do Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia:

Prof. Nelson Rodrigo da Silva Martins

Editor convidado para esta edição:

Prof. Benito Soto Blanco

Revisora autônoma:

Giovanna Spotorno

Tiragem desta edição:

9.550 exemplares

Layout e editoração:

Soluções Criativas em Comunicação Ldta.

Impressão:

O Lutador

Permite-se a reprodução total ou parcial, sem consulta prévia, desde que seja citada a fonte.

Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia. (Cadernos Técnicos da Escola de Veterinária da UFMG)

N.1- 1986 - Belo Horizonte, Centro de Extensão da Escola deVeterinária da UFMG, 1986-1998.

N.24-28 1998-1999 - Belo Horizonte, Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, FEP MVZ Editora, 1998-1999

v. ilustr. 23cm

N.29- 1999- Belo Horizonte, Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, FEP MVZ Editora, 1999¬Periodicidade irregular.

1. Medicina Veterinária - Periódicos. 2. Produção Animal - Periódicos. 3. Produtos de Origem Animal, Tecnologia e Inspeção - Periódicos. 4. Extensão Rural - Periódicos.

I. FEP MVZ Editora, ed.

Prefácio

Prof. Nelson Rodrigo da Silva Martins
- CRMV-MG 4809
Profa. Roselene Ecco - CRMV-MG 8324

A expansão da produção avícola no país, na concepção contemporânea de produtividade e qualidade, diretamente ligada ao *status* sanitário dos plantéis, demandou a preparação desta primeira edição dos Cadernos Técnicos exclusiva em sanidade avícola. Embora artigos isolados tenham sido publicados em edições anteriores, deliberou-se por uma edição que reunisse em um único volume os principais tópicos em doenças previstas e não previstas na legislação sanitária brasileira e internacional. A avicultura comercial e os profissionais da área enfrentam novos desafios em doenças novas e/ou reemergentes, necessitando de atualização regular da informação. Preparou-se aqui uma edição atualizada e com significativa revisão da literatura, especialmente consultando artigos científicos, as publicações e normas da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) e capítulos de livros mais relevantes. Os capítulos contêm descrições da etiologia, epidemiologia, transmissão, patogênese, sinais clínicos, diagnóstico, controle e prevenção. No diagnóstico imprime-se enfoque nas metodologias previstas na legislação (PNSA - Programa Nacional de Sanidade Avícola), assim como as técnicas mais usuais e modernas, incluindo a descrição das lesões macroscópicas e histológicas que permitem o diagnósti-

co diferencial, coleta e conservação das amostras. Os colaboradores em cada um dos capítulos são profissionais e estudantes engajados no diagnóstico e pesquisa das doenças descritas. O diagnóstico exato e precoce é fundamental para redução dos prejuizos com mortalidade e prevenção de novos surtos, e o advento dos métodos moleculares e sorológicos facilmente disponíveis, desafiam os profissionais que atuam na área com novos paradigmas, às vezes conflitantes. Logo, são incluídas algumas considerações sobre as doenças causadas por infecções que produzem estado de portador ou latência, assim como infecções decorrentes da circulação de estirpes vacinais atenuadas ou não, que exigem diferenciação e interpretação dos resultados. Ressalta-se a importância de o profissional que atua na área da sanidade conhecer e interpretar todos os aspectos da doença, assim como os testes que permitem o diagnóstico diferencial. Recomenda-se ao profissional a consulta regular às publicações preparadas pela OIE (www.oie.int) e Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (www.agricultura.gov), para a sua atualização contínua. A avicultura é a pecuária mais pujante no país e em grande parte do mundo, e a que oferece mais oportunidades de trabalho para o profissional. As doenças abordadas nesta edição são exóticas, pré-existentes, emergentes ou reemergentes na avicultura, e sua leitura poderá representar uma preparação adicional para seu enfrentamento.

Sumário

1. Influenza Aviária 9

Nelson Rodrigo da Silva Martins, Maurício Resende, Priscilla Rochele Barrios, Sandra Yuliet Marin

A avicultura comercial brasileira é livre de influenza aviária, em conformidade com as determinações da OIE (Organização Mundial de Sanidade Animal) para o comércio internacional.

2. Doença de Newcastle 33

Nelson Rodrigo da Silva Martins, Roselene Ecco

A avicultura comercial e de exportação brasileira atualmente mantêm-se livre da doença de Newcastle, em conformidade com as recomendações de OIE (Organização Mundial de Sanidade Anima).

3. Bronquite Infecciosa das Galinhas 49

Nelson Rodrigo da Silva Martins, José Sérgio de Resende, Josiane Tavares de Abreu, Maurício Resende

A bronquite infecciosa das galinhas é causada por um coronavirus aviário e representa a principal doença respiratória, do sistema excretor e reprodutivo de galinhas.

4. Doença de Marek 57

Nelson Rodrigo da Silva Martins, Sandra Yuliet Marin, Roselene Ecco, Ana Caroline Doyle Torres

A doença de Marek é a principal doença tumoral de linfócitos de galinhas domésticas, com vacinação obrigatória, aplicada via subcutânea no 1º dia ou no 18º dia de incubação.

5. Anemia Infecciosa das Galinhas 64

Sandra Yuliet Marin, Priscilla Rochele Barrios, Nelson Rodrigo da Silva Martins

A anemia infecciosa das galinhas provoca a destruição de linfócitos T e na medula óssea provoca anemia, estando entre as principais causas de imunodepressão na avicultura industrial.

6. Doença Infecciosa da Bursa 71

Nelson Rodrigo da Silva Martins, Maurício Resende, Priscilla Rochele Barrios, Sandra Yuliet Marin

A doença infecciosa da bursa provoca a atrofia precoce da bolsa de Fabricio (bolsa cloacal), o órgão responsável pela maturação de linfócitos B em aves.

7. Laringotraqueíte Infecciosa das Aves e Diagnóstico Diferencial de Outras Doenças Respiratórias 79

Roselene Ecco, Nelson Rodrigo da Silva Martins

A laringotraqueíte infecciosa é doença respiratória grave e de caráter agudo nos primeiros episódios. Os plantéis persistentemente infectados mantêm infecção crônica, de baixa expressão clínica, e com infecção vitalícia.

8. Micoplasmoses 96

Ana Caroline Doyle Torres, Hannah Luiza Gonsalves Coelho, Sarah Ferreira Cunha, Maurício Resende, Roselene Ecco, Sandra Yuliet Marin, Carolina Fontes Prezotto, Nélson Rodrigo da Silva Martins

As micoplasmoses por Mycoplasma gallisepticum (doença crônica respiratória), M. synoviae (sinovite infecciosa) e M. meleagridis (micoplasmose dos perus), são de erradicação obrigatória em reprodutores da avicultura comercial.

9. Salmoneloses 108

Ana Caroline Doyle Torres, Sandra Yuliet Marin, José Sérgio de Resende, Nelson Rodrigo da Silva Martins

As salmoneloses por Salmonella Gallinarum-Pullorum, S. Enteritidis e S. Typhimurium são de erradicação obrigatória para reprodutores da avicultura comercial, pelos potenciais graves efeitos nos hospedeiros sensíveis.

10. Miopatia em Frangos De Corte 117

Roselene Ecco, Juliana Fortes Vilarinho Braga

As miopatias em frangos de corte podem estar em crescente ocorrência na avicultura de corte em razão do melhoramento genético e da nutrição, voltados para maior ganho de massa muscular.

11. Colibacilose em Aves Comerciais.....126

Juliana Fortes Vilarinho Braga, Roselene Ecco, Nelson Rodrigo da Silva Martins

As colibaciloses são causadas por variadas estirpes de Escherichia coli e representam as principais infecções e doenças bacterianas de aves comerciais.

1. Influenza aviária

bigstockphoto.com

Nelson Rodrigo da Silva Martins[1] *- CRMV-MG 4809*
Maurício Resende[2]
Priscilla Rochele Barrios[3] *- CRMV-MG 7173*
Sandra Yuliet Marin[4]
[1] *Professor associado, médico veterinário CRMV, mestre e doutor, DMVP, Escola de Veterinária, UFMG*
[2] *Professor titular aposentado, médico veterinário CRMV, mestre e doutor, DMVP, Escola de Veterinária, UFMG*
[3] *Professora associada, médica veterinária CRMV, mestra e doutora, Departamento de Veterinária, UFLA*
[4] *Pós-doutoranda, DMVP, Escola de Veterinária, UFMG.*

Introdução

A influenza aviária é uma enfermidade exótica para a avicultura comercial brasileira. Não ocorre em nenhuma espécie da avicultura industrial do país, em nenhuma forma de apresentação ou de subtipo viral, o que está em conformidade com as normas sanitárias internacionais [4, 5]. A Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) determina as doenças de relevância internacional (Tab. 1). O Brasil está em conformidade para o comércio internacional, sendo o maior exportador de carne de aves do planeta [65].

A influenza aviária é uma enfermidade exótica para a avicultura comercial brasileira. Não ocorre em nenhuma espécie da avicultura industrial do país, em nenhuma forma de apresentação ou de subtipo viral, o que está em conformidade com as normas sanitárias internacionais.

Gripe aviária é o termo popular para influenza aviária (AI, de *avian influenza*, em inglês), que

designa desde infecção subclínica até doença hiperaguda, causadas por uma grande variedade de vírus influenza (AIV, *avian influenza virus*).

As aves domésticas em criações intensificadas, especialmente galinhas e perus, e os mamíferos, como suínos [16], felinos e humanos, são muito sensíveis à infecção e doença. O risco de infecção ocorre com a proximidade das aves reservatório natural a criatórios ou no ambiente natural, ou, ainda, com a proximidade de aves domésticas infectadas [1, 3, 15, 59, 60, 61]. A infecção em aves e mamíferos, inclusive humanos, é considerada aberrante ou não natural. A adaptação viral à espécie doméstica pode resultar em emergência sanitária para múltiplas espécies, como aconteceu em galinhas em Hong Kong, em 1997, dando origem às estirpes do subtipo H5N1 [8, 60]. Entretanto, galinhas e frangos de corte são criações com alto índice técnico, com genética, *status* sanitário, manejo, nutrição, acomodações e ambiência determinados em manuais técnicos de criação e com atenção à legislação sanitária (PNSA). Em contrapartida, as aves da fauna estão sujeitas às condições naturais, com algumas espécies atuando como sentinelas das condições epidemiológicas para HPAIV. Por essa razão, espécies migratórias com maior probabilidade de infecção são monitoradas nos locais de concentração na costa brasileira e no interior do país [Ilha do Parazinho (AP); Reentrâncias Maranhenses (MA); Coroa do Avião (PE); Mangue Seco (BA); Pantanal (MT) e Parque Nacional Lagoa do Peixe (RS)]. Os locais em que há amostregem de aves domésticas (Fig. 1) estão indicados em verde no mapa.

As infecções em aves, em outros animais domésticos e em humanos são consideradas aberrantes, não naturais, situação que emerge com a proximidade com os reservatórios naturais.

AIV, assim como muitos outros vírus RNA, inclusive birnavírus, coronavírus, flavivírus e retrovírus, comporta-se como uma população heterogênea de vírus, com pequenas diferenças genéticas (*quasispecies*) [18] em regiões hipervariáveis do genoma [15, 43, 46, 70]. Outro mecanismo de geração de mudança genética, a recombinação (do tipo rearranjo), está ligado ao genoma segmentado de AIV, que permite a mistura de segmentos de diferentes origens durante coinfecção [15, 30, 44, 48, 62, 73].

As infecções em aves, em outros animais domésticos e em humanos são consideradas aberrantes, não naturais, situação que emerge com a proximidade dos reservatórios naturais [11, 15, 35, 36, 44, 48, 73]. Essa condição ocorre mais facilmente no sudeste asiático [8, 62]. Historicamente, os episódios

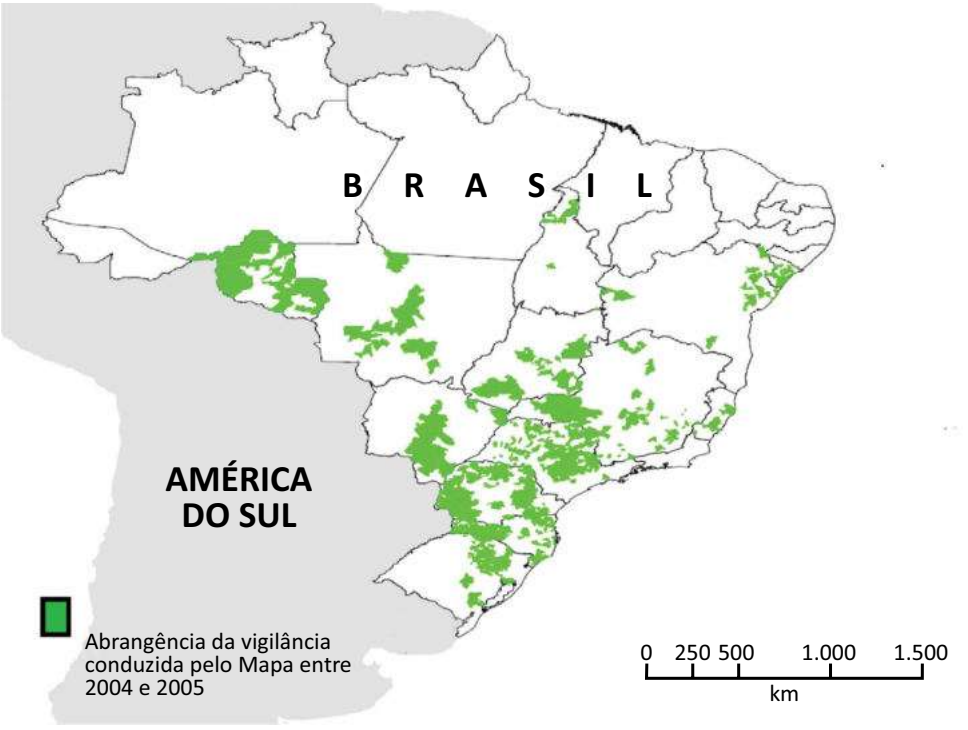


Figura 1. Amostragem de aves domésticas.

Fonte: MOTA, M.A.; LIMA, F.S.; OLIVEIRA, P.F.N. and GUIMARAES, M.P.. Ações de vigilância para influenza aviária desenvolvida no Brasil, no período de 2004 e 2007. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. [online]. 2013, vol.65, n.5 [cited 2015-04-10], pp. 1265-1273 .

de influenza aviária em aves domésticas estiveram relacionados à criação em proximidade e/ou convívio com aves reservatório natural. Em Hong Kong, a venda de aves em mercados de aves vivas resultou em condições para o surgimento das estirpes de HPAIV do subtipo H5N1, com impacto na avicultura e na saúde humana [60]. Os mercados de aves vivas são proibidos no Brasil.

As aves reservatório natural abrigam infecções subclínicas de AIV, por estirpes que são, tipicamente, não patogênicas. Entretanto, desde 1997, com a emergência da infecção de aves e humanos por H5N1 aviário nos mercados de aves vivas de Hong Kong, com mortalidade humana e de aves [8, 60], as espécies reservatório natural têm também sofrido infecção letal. As novas estirpes de HPAIV do subtipo H5N1 causam doença grave com alta mortalidade em aves silvestres [1, 3, 59, 60, 62].

As ocorrências de AIV em humanos estiveram historicamente associadas à adaptação primária de AIV em suínos [15, 44, 48, 73]. Entretanto, os episódios de Hong Kong (1997) foram os primeiros relatos de transmissão direta de ave para humano [8, 60]. As

estirpes derivadas de H5N1 de Hong Kong, por apresentarem alto índice de letalidade humana, em torno de 60%, têm recebido atenção internacional pelo potencial em repetir em humanos, uma pandemia semelhante à denominada "gripe espanhola", de 1918 [69, 70, 71, 72]. Até 14 de fevereiro de 2015, foram registrados 694 casos de influenza aviária em humanos, com 402 óbitos (57,9%), e os países com maiores ocorrências foram Egito (203 casos e 72 óbitos), Indonésia (197 casos e 165 óbitos) e Vietnã (127 casos

Tabela 1. Doenças de notificação obrigatória para a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE)

Nome	Etiologia
Clamidiose aviária (Avian chlamydiosis)	*Chlamydophila psittaci*
Bronquite (Avian infectious bronchitis)	IBV, *Gammacoronavirus*, *Coronaviridae*
Laringotraqueíte infecciosa das aves (Avian infectious laryngotracheitis)	GaHV-1; ILTV, *Iltovirus*, *Alphaherpesvirinae*
Micoplasmose aviária (Avian mycoplasmosis)	*Mycoplasma gallisepticum*
Micoplasmose aviária (Avian mycoplasmosis)	*Mycoplasma synoviae*
Hepatite viral dos patos (Duck virus hepatitis)	DHBV, Avihepadnavirus, *Hepadnaviridae*
Cólera aviária (pasteurelose aviária) (Fowl cholera)	*Pasteurella multocida*
Tifo aviário (Fowl typhoid)	*Salmonella enterica enterica* Gallinarum
Influenza aviária de alta e baixa patogenicidade em aves domésticas - Código de Saúde dos Animais Terrestres, capítulo 10.4 (Highly pathogenic avian influenza and low pathogenic avian influenza in poultry - Chapter 10.4 - Terrestrial Animal Health Code)	Alta patogenicidade: vírus influenza A subtipos H5 ou H7; qualquer combinação de H1 a H16 e N1 a N9 com código genético para múltiplos aminoácidos básicos (3 a 5) no sítio de clivagem da hemaglutinina; ou índice intravenoso (IPIV) superior a 1,2 em aves SPF; baixa patogenicidade: todas as combinações de subtipos sem o código acima e com IPIV maior que 1,2 em aves experimentais
Doença infecciosa bursal ou doença de Gumboro (Infectious bursal disease, Gumboro disease)	IBDV, *Birnavirus*, *Birnaviridae*
Doença de Marek (Marek's disease)	GaHV-2, Gallid Herpesvirus 2, *Mardivirus*, *Alphaherpesvirinae*
Doença de Newcastle (Newcastle's disease)	Paramyxovirus aviário 1, *Avulavirus*, *Paramyxoviridae*
Pulorose (Pullorum disease) (Salmonella pullorum)	*Salmonella enterica enterica* Pullorum
Rinotraqueíte dos perus (Metapneumovirose aviária) (Turkey rhinotracheitis)	AMPV, *Avian Metapneumovirus*, *Paramyxoviridae*

Fonte: www.oie.org.

e 64 óbitos) (Fig. 2), com letalidade, respectivamente, de 35,4%, 83,7% e 50,4%, variação em decorrência de diferenças na qualidade do atendimento hospitalar entre os países [9, 69, 70, 71, 72].

Estudos oficiais (Fig. 3) e acadêmicos [28] foram desenvolvidos para a monitoração das aves reservatório natural.

Etiologia

A influenza aviária é causada por vírus da família Orthomyxoviridae, gênero *Influenzavirus A*, denominados vírus da influenza aviária (AIV, da sigla em inglês *avian influenza virus*) [15, 44, 48, 73]. O vírus tem projeções superficiais formadas por glicoproteínas ancoradas no envelope lipídico, a hemaglutinina (H) e a neuraminidase (N). Em aves há 16 subtipos

Figura 2. Casos humanos cumulativos e confirmados à Organização Mundial de Saúde Animal entre 2003 e 2015.

PAÍS	2003-2009		2010		2011		2012		2013		2014		Total	
Azerbaijão	8	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	5
Bangladesh	1	0	0	0	2	0	3	0	1	1	0	0	7	1
Camboja	9	7	1	1	8	8	3	3	26	14	9	4	56	37
Canadá	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1
China	38	25	2	1	1	1	2	1	2	2	2	0	47	30
Djibouti	1	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0	1	0
Egito	90	27	29	13	39	15	11	5	4	3	30	9	203	72
Indonésia	162	134	9	7	12	10	9	9	3	3	2	2	197	165
iraque	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	2
República Democrática do Laos	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2
Myanmar	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Nigéria	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
Paquistão	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	1
Tailândia	25	17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	25	17
Turquia	12	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12	4
Vietiname	112	57	7	2	0	0	4	2	2	1	2	2	127	64
Total	**468**	**282**	**48**	**24**	**62**	**34**	**32**	**20**	**39**	**25**	**45**	**17**	**694**	**402**

*2003-2009 total figures. Breakdowns by year available on next table
Total number of cases incluides numbers of deadths
WHO reports only laboratory cases
All dates refer to onset of illness

Figura 3. Amostras de aves migratórias recolhidas entre 2003-2004 por unidade da federação e analisadas pelo Lanagro. Foram encontrados LPAIV H2, H3 e H4.		
Ano	**Localidade**	**Amostras testadas**
2006	BA*	814 + 157
2006	RS*	74 + 75
2004	RS	3528
2004	PR	5220
2004	AP	8118
2004	MA	10800
2003	PE	2160
2003	AM	3654
2003	PE	1530
2003	AM	5364
2003	PE	738
2003	PE	738

de H e nove subtipos de N, que podem estar arranjados em qualquer combinação. Mais recentemente, foram descritos os novos subtipos H17 e H18 e N10 e N11, em morcegos nas Américas Central e do Sul, subtipos não encontrados em aves. O RNA de fita simples com 13.600 nucleotídeos está disposto em oito segmentos, cada um encapsidado pela nucleoproteína separadamente. Os oito segmentos constituem característica que permite a permuta (rearranjo) de segmentos em coinfecções. Os segmentos de RNA codificam oito proteínas estruturais e três não estruturais (Fig. 4) [15, 44, 48, 73].

As estirpes que causam doença em aves Gallus gallus domesticus *(frango de corte e galinha de postura) são geralmente dos subtipos H5 ou H7.*

As estirpes de AIV pandêmicas na Ásia, com episódios na Europa e África, são de alta patogenicidade e derivadas da estirpe de Hong Kong de 1997 (A/Chicken/Hong Kong/220/1997 H5N1).

As estirpes de AIV podem ser de baixa patogenicidade (LPAIV, sigla em inglês para *low pathogenicity avian influenza virus*) ou de alta patogenicidade (HPAIV, *high pathogenicity* AIV). A doença em aves *Gallus gallus domesticus* (frango de corte e galinha de postura) e perus é geralmente causada por estirpes dos subtipos H5 ou H7 [1, 3, 59, 62, 63].

A hemaglutinina está subdividida

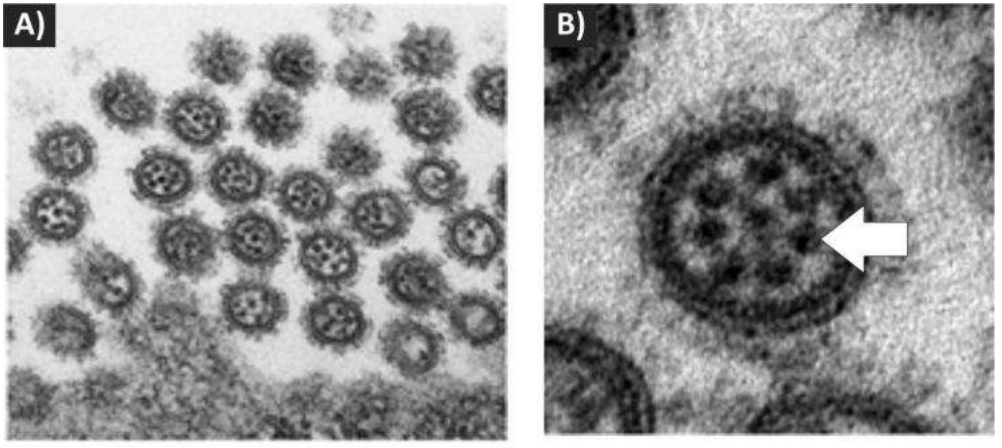


Figura 4.

A) Partículas sendo liberadas da célula infectada. Notar que, no interior das partículas de AIV, é possível a visualização de oito pontos pretos, correspondentes a cada segmento de RNA.

B) Maior magnificação de A.
Os oito segmentos de ribonucleoproteína são visíveis (seta branca).

Micrografias eletrônicas de influenza vírus, de Yoshi Kawaoka e Takeshi Noda, em Palese & Shaw, Orthomyxoviridae, Fields Virology, 2007.

C) Eletroforese em gel de poliacrilamida de RNA de vírus marcado com 32P- RNA, de estirpes influenza dos tipos A, B e C purificados . Canaleta A, influenza A/PR/8/34, canaleta B, influenza B/Lee/40 e canaleta C influenza C/JHB/1/66.

Ps: segmentos codificadores do complexo polimerase PB1, PB2 e PA.

HA: hemaglutinina; NP: nucleoproteína; NA: neuraminidase; M: matriz; NS: não estrutural.

Fonte: Palese & Shaw, Orthomyxoviridae, Fields Virology, 2007.

em H_1 e H_2. A região H_1 é mais externa e adsorve receptores celulares. Na região de H_2, denominada glicoproteína da fusão (F), que permite a entrada na célula, encontra-se o principal determinante de patogenicidade em AIV [15, 44, 48, 73]. As diferenças principais que determinam as estirpes serem LPAIV ou HPAIV associam-se à região de clivagem enzimática de F. A ativação (reconhecimento e clivagem) de F por enzimas (furinas) do complexo de Golgi ocorre intracelularmente nas estirpes HPAIV, característica determinante de alta patogenicidade. As estirpes de LPAIV têm F ativada apenas fora da célula, por enzimas da família das tripsinas, principalmente no sistema digestório. A região de F que sofre a ação enzimática tem uma sequência de múltiplos aminoácidos básicos (arginina e/ou lisina) na região ativada. Essa característica é determinante de patogenicidade, e sua demonstração e sequenciamento são utilizados em diagnóstico [1, 3, 59, 62, 63].

Em termos gerais, são consideradas características determinantes de patogenicidade para uma estirpe de AIV: (1) possuir sequência de múltiplos aminoácidos básicos no sítio de clivagem da glicoproteína da fusão, (2) possuir hemaglutinina H5 ou H7 e (3) causar mortalidade de aves SPF inoculadas [1, 3, 59, 62, 63].

O Brasil é livre de AIV na avicultura industrial, e o Mapa determina, no Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA), as normas para o enfrentamento de surtos e a manutenção do *status* de doença exótica no país [4, 5]. Um plano de contingência, que integra os Ministérios da Agricultura, Meio Ambiente e Saúde, está em ação no Brasil, no qual há a monitoração de aves migratórias, com a pesquisa de quaisquer infecções por AIV, vírus das encefalites equina e do oeste do Nilo. A vigilância ativa dos plantéis comerciais baseia-se na amostragem regular de aves e no diagnóstico laboratorial de todos os casos suspeitos. Em aves domésticas não comerciais e de subsistência, estirpes de baixa patogenicidade foram detectadas por métodos moleculares [28]. A notificação é obrigatória para quaisquer mortalidades acima de 10% na produção e acima de 1% no transporte e exige o diagnóstico etiológico [4, 5].

O plano de contingência em humanos mantém a monitoração de quadros de doença respiratória, especialmente viajantes vindos da Ásia e de áreas atingidas por H5N1 com sinais sugestivos. A doença em humanos poderá surgir independentemente das aves, trazida, por exemplo, nos aeroportos pelas viagens intercontinentais [2].

Estratégias evolutivas de AIV

Os vírus RNA consistem de uma complexa distribuição de genomas mutantes, nunca de sequências idênticas. De acordo com o conceito de *quasis-*

pecies moleculares, polinucleotídeos (RNA e DNA) devem manter regularidade na composição (fidelidade de cópia) ao mesmo tempo em que devem manter evolução (resultante de erro de cópia - mutação) [19], dentro de limites precisos, para que se mantenham as características da espécie, assim como um repertório de mutantes, em um mecanismo darwiniano de seleção natural de variações preexistentes (Fig. 5) [18, 19]. A "transição para erro catastrófico", em que há violação do limiar máximo de erro, resulta em transição irreversível para a extinção [18]. No caso de AIV, como de outros vírus RNA, as mutações do RNA permitem a diversidade necessária para a evolução.

As polimerases dos vírus RNA não dispõem de sistema de verificação de erro [18, 44, 48, 73]. Em contraste, os vírus DNA mais complexos (genoma mais longo), para a viabilidade evolutiva, é necessário existir sistema de verificação e reparo mediado pelas polimerases mais complexas. A taxa de mutação calculada para os vírus RNA pode variar entre 10-3 a 10-5 substituições por nucleotídeo copiado. Para um vírus RNA com genoma entre 3 x 103 e 32 x 103, a média de mutação de 0,1 a 1 base pode ser esperada por vírion, aproximadamente o que seria esperado para AIV, com genoma de 13,6 x 10^3 [18].

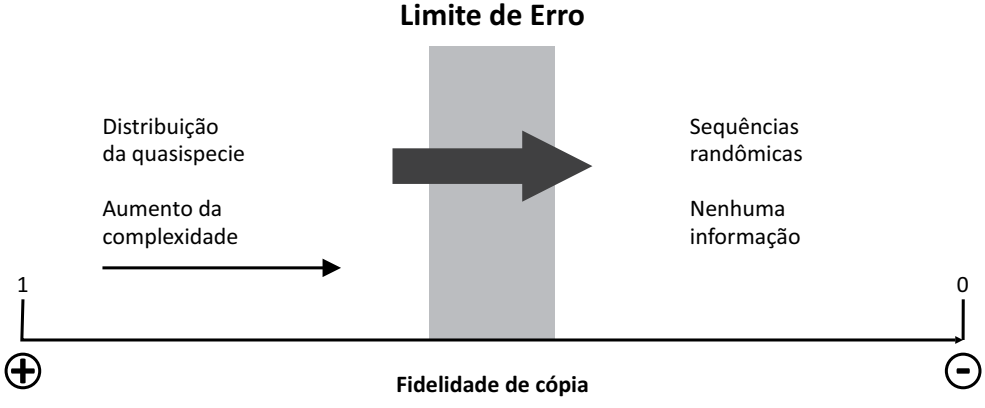


Figura 5. Representação esquemática de vírus e o eventual risco de erro catastrófico [18]. A fidelidade 1 (extrema esquerda) implica todas as moléculas genômicas idênticas (entropia de Shannon igual a zero; uma presunção irreal para todas as formas de vida conhecidas). Com o declínio da fidelidade (para a direita), a complexidade dos mutantes aumenta. Para cada sistema replicante, existe uma fidelidade de cópia crítica, abaixo da qual a informação não é mantida. A fidelidade crítica é denominada "limiar de erro". A seta central demonstra a transição até a perda de informação, que pode ser visualizada como a transição de sequências nucleotídicas genômicas virais para sequências randômicas sem sentido. A coluna na zona de transição (central) é larga para representar diferentes valores de limiar de erro para diferentes sistemas virais [18]. Fonte: Domingo, E. Virus Evolution. Introduction: Virus Origins and Evolution. Editors: Knipe, David M.; Howley, Peter M. Fields Virology, 5ª Edição, 2007.

Epidemiologia

As infecções benignas por estirpes de LPAIV, formando um *pool* natural de AIV, são mantidas nas aves reservatório natural, tipicamente as aves migratórias aquáticas e de praia [15, 44, 48, 73]. São muitas as espécies de aves aquáticas e de praia, da ordem **Anseriformes** (150 espécies): patos, marrecos, gansos, cisnes, etc., das famílias Anhimidae, Anseranatidae e Dendrocygnidae; da ordem **Charadriiformes** (350 espécies), como o maçarico, chamadas limícolas, da família Scolopacidae, com 20 gêneros e mais de 100 espécies, por exemplo, *Calidris alba*, que passa o inverno na América do Sul, e corre-praias; a ordem tem seis subordens e 20 famílias; subordem Lari, gaivotas e afins, com seis gêneros, por exemplo: gênero *Larus* (gaivotas), com 49 espécies, Procellariidae –, Diomedeidae – 14 espécies, Hydrobatidae – 20 espécies, Pelecanoididae – quatro espécies; e da ordem **Ciconiiformes** (19 espécies), com uma família e seis gêneros. No Brasil ocorre a migração de 74 espécies, principalmente norte-sul, vindas da América do Norte, ou sul-norte, vindas da Patagônia [10].

As aves reservatório natural mantêm todos os 16 diferentes subtipos de hemaglutininas e nove de neuraminidases. Em países frios, o congelamento de inverno pode preservar vírus na água nos sítios de reprodução e, assim, infectar as novas gerações [57]. Em termos gerais, as aves reservatório natural migratórias nas Américas (sentido norte-sul) fazem escalas para descanso e alimentação nas áreas tropicais [44]. Considerando a estrutura lipoproteica do envelope e a necessidade de sua integridade para a infecção, o AIV pode ser destruído por insolação no ambiente natural (principalmente regiões tropicais). Nessas regiões, ocorre também menor multiplicação viral nas aves reservatório. Nas regiões tropicais (El Salvador, Guatemala e Panamá), para influenza humana, as variações estacionais de ocorrência estariam associadas à umidade relativa do ar, com maior ocorrência na estação das chuvas [55], em contraste com regiões subtropicais e temperadas com a estacionalidade favorecida pelas estações frias [44]. Entretanto, estudos na África subsaariana indicaram que as aves migratórias (Anseriformes) entre Eurásia e África mantêm circulação da infecção durante o ano em uma proporção de aves, com transmissão de uma diversidade de AIV durante a invernada africana (África ocidental, interior do delta do rio Niger, delta do rio Senegal e lago Chad [27]. As ocorrências mun-

Em países frios, o congelamento de inverno pode preservar vírus na água nos sítios de reprodução e, assim, infectar as novas gerações.

diais com diagnóstico laboratorial notificadas à OIE no primeiro semestre de 2015 (até fevereiro) estão apresentadas na Fig. 6. Há uma preocupação recente com as ocorrências na América do Norte pelas estirpes recombinantes dos subtipos H5N1, H5N2 e H5N8 contendo genes da Eurásia e da América do Norte [47].

As notificações de HPAIV H5N1 à OIE atingiram 2.726 surtos no Vietnã, 1.141 na Tailândia, 1.084 no Egito, 1084 na Romênia, 548 em Bangladesh, 261 na Indonésia, 230 no Nepal, 219 na Turquia, 150 na Rússia e 127 na China, incluindo 51 países até fevereiro de 2015 (Fig. 7) [45].

Em 2014 e 2015, a América do Norte foi atingida por vários episódios de doença clínica e infecção subclínica por estirpes dos subtipos H5N1 (subclínica), H5N2 e H5N8 (ambos com manifestação clínica), casos em razão de contato com aves reservatório natural, na rota migratória do Pacífico. Nos Estados Unidos da América, as ocorrências foram registradas em aves Anseriformes, família Anatidae: *Anas platyrhynchos, Anas americana, Anas acuta, Anas clypeata* e *Aix sponsa* (patos); em Falconiformes, família Accipitridae: *Buteo jamaicensis* (gavião) *Falco peregrinus* (falcão) e *Haliaeetus leucocephalus* (águia-careca); e em Strigiformes, família Strigidae: *Bubo virginianus*, nos estados de Idaho, Oregon e Washington [47].

No sudeste asiático, onde surgiu

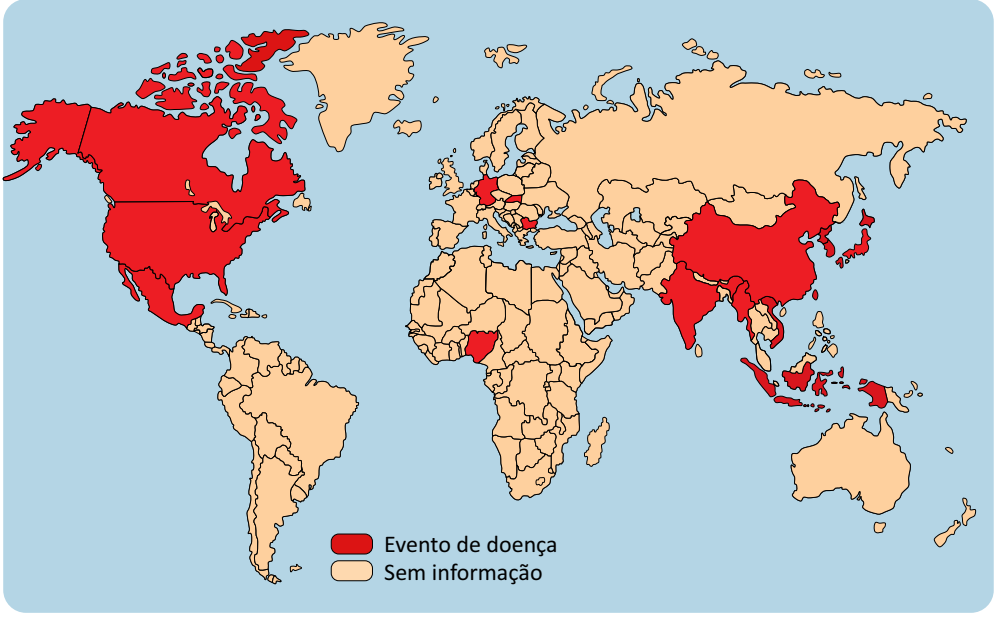


Figura 6. Influenza aviária de alta patogenicidade com confirmação laboratorial notificada até março de 2015. Notar a preocupante ocorrência de H5N1, H5N2 e H5N8 na América do Norte [47].

em 1997 a estirpe HPAIV A/Chicken/Hong Kong/220/97, e nos países e regiões mais recentemente atingidos, Indonésia, Vietnã, Turquia, Egito e Nigéria, há proximidade entre as criações domésticas e as aves reservatório natural com as espécies susceptíveis criadas em condições de exposição e comercializadas vivas e/ou com menor controle do comércio e da qualidade de produtos avícolas, o que permite as transferências de infecções, inclusive

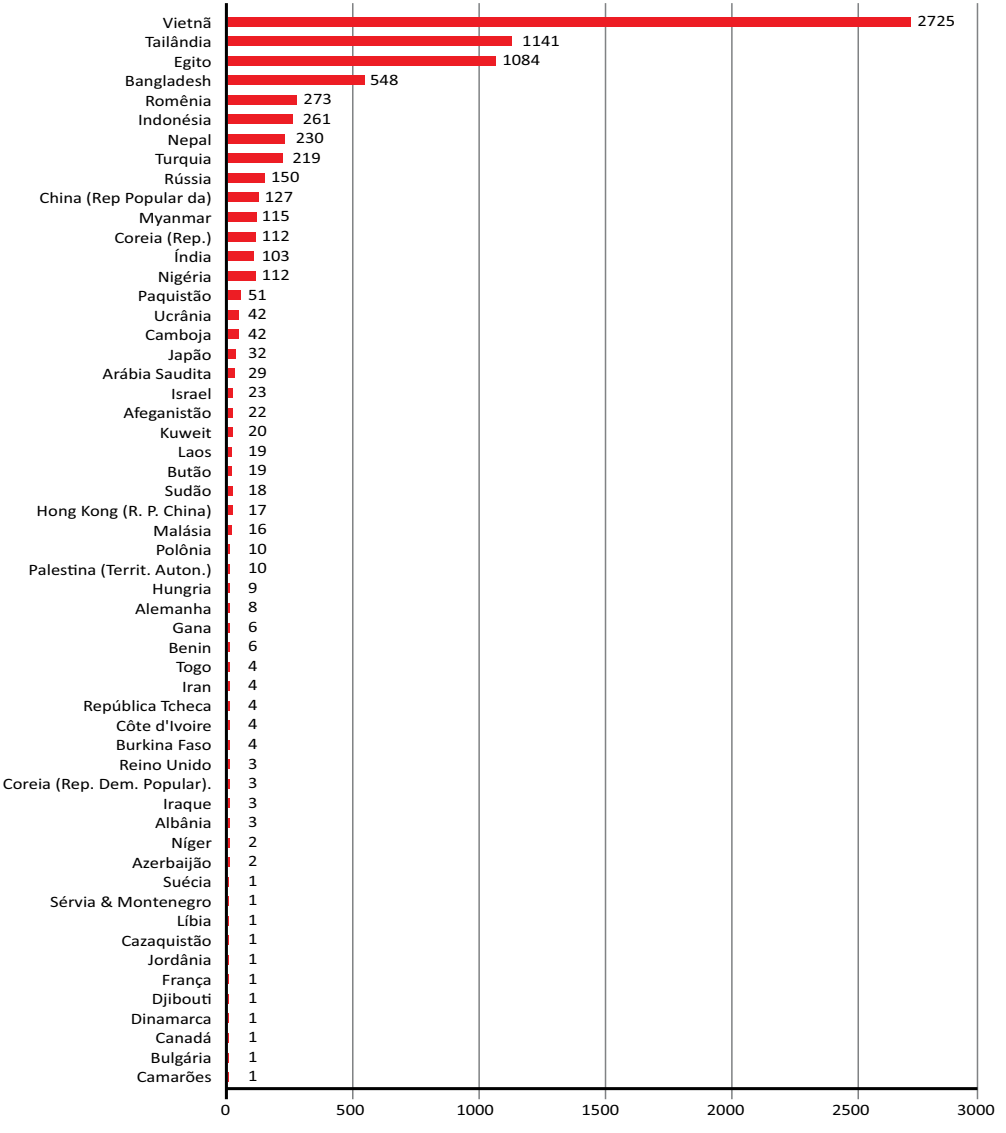


Figura 7. Influenza aviária de alta patogenicidade com confirmação laboratorial notificada entre 2003 e fevereiro de 2015 [45].

para humanos [8, 60]. Na história das pandemias prévias, os suínos tiveram importância na geração de mutantes e recombinantes de aves e humanos, condição comumente encontrada no sudeste asiático [69, 70, 71, 72].

Aves domésticas

Embora AI seja exótica no Brasil, os frangos de corte, a principal indústria avícola brasileira, têm risco zero ou desprezível de infecção, tendo em vista o uso de galpões fechados à prova de entrada de aves da fauna migratória e de vida livre. Entretanto, estirpes de LPAIV foram detectadas na avicultura de subsistência [28]. A instrução normativa IN 59, que propunha a colocação de tela em galpões de postura comercial como forma de assegurar biossegurida-de, foi revogada com a IN 10 de 2013, que exige o teste regular das aves para *Salmonella*.

Nas condições de criação nos países do sudeste asiático, da Ásia Central, do Oriente próximo e em alguns países da Europa e da África, as aves domésticas têm sido criadas próximo das aves reservatório, o que tem resultado no surgimento de estirpes variantes. Em aves domésticas os AIV sofrem mutações naturais que podem gerar estirpes de alto risco. Além disso, as aves domésticas infectadas podem sofrer múltiplas infecções, que permitem a geração de recombinantes de alta patogenicidade [15, 44, 48, 73].

Os suínos e felinos domésticos são muito sensíveis às infecções por HPAIV e podem produzir carga de desafio viral mais intenso e mais adaptado aos humanos [16, 18, 43, 46, 70]. Em aves, a transmissão ocorre devido à proximidade e à exposição da ave portadora, sintomática ou não, em relação à ave susceptível, por aerossóis respiratórios inalados, ou com a ingestão de alimento ou água contaminados [1, 3, 44, 59, 62, 63].

A doença por estirpes de HPAIV em galinhas e perus pode causar 100% de morbidade e mortalidade, de forma aguda ou superaguda, com hemorragias generalizadas, na pele, nos sistemas respiratório e digestório, e infecção do sistema nervoso central. A morte ocorre por falência múltipla de órgãos, principalmente causada por "tempestade de linfocinas". Algumas formas superagudas podem causar a morte com poucas lesões detectáveis [1, 3, 59, 62, 63, 64].

As aves reservatório natural podem ser mais resistentes à manifestação clínica em infecções por HPAIV, e a proximidade com aves domésticas, especialmente galinhas e perus, pode permitir a ocorrência de surto (doença clínica).

Transmissão e doença

O AIV pode ser transmitido, por via direta, da ave infectada para a ave sensível por aerossóis respiratórios, por excretas e fezes e por quaisquer secreções [1, 3, 15, 59, 62, 63, 64]. A proximidade favorece a transmissão, mas não é essen-

As definições de alta patogenicidade para vírus de influenza em aves foram descritas [1, 3, 4, 5, 59, 62, 63, 64] e são resumidas em:

a) Qualquer vírus letal para seis, sete ou oito galinhas SPF de oito semanas de idade, em até 10 dias de observação após a inoculação intravenosa de 0,2mL de uma diluição 1:10 de líquido alantoide hemaglutinante (HA+) e livre de bactérias, obtido de embriões SPF inoculados.
b) O teste adicional é requerido se o isolado replicadoem ovo (HA+), em inoculação como a descrita acima, matar entre uma e cinco galinhas, e não for dos subtipos H5 ou H7: cultivo em células em monocamada com formação de efeito citopático sem a adição de tripsina.
c) Para todos os isolados H5 ou H7 de baixa patogenicidade e outros subtipos com replicação em cultivos de células em monocamada sem a adição de tripsina: sequenciamento genético para código ou sequenciamento proteico dos aminoácidos no peptídeo de conexão da hemaglutinina (sítio de clivagem da hemaglutinina) semelhante às estirpes de alta patogenicidade (HPAIV).

cial, pois o AIV pode ser transmitido via indireta, pela contaminação de equipamentos, comedouros e bebedouros. O congelamento de lagos nos climas frios preserva o AIV para infecção das novas gerações [44, 57].

Há grandes diferenças entre os riscos de infecção em aves reservatório natural ou em aves domésticas. As aves reservatório natural são aquáticas, principalmente das ordens Anseriformes e Charadriiformes (aves de praia; maçarico e afins; gaivotas e afins; fura-buchos e afins), e mantêm infecção natural de caráter benigno e por estirpes de baixa patogenicidade [15, 44, 48, 73]. Essa condição de equilíbrio é modificada pela intervenção humana, seja com a criação de aves e outros animais domésticos, seja com populações humanas nas proximidades dos sítios de aves reservatório natural.

Há grande variação de manifestações clínicas, dependentes do patotipo de AIV. Outras variáveis importantes incluem espécie de hospedeiro, fatores ambientais, idade, sexo, presença de infecção concomitante e estado imune.

Sinais clínicos

Há grande variação de manifestações clínicas, dependentes do patotipo de AIV. Outras variáveis importantes incluem espécie de hospedeiro, fatores ambientais, idade, sexo, presença de infecção concomitante e

estado imune [1,3, 59, 62]. As infecções por estirpes LPAIV podem não provocar sinais clínicos perceptíveis, embora possa haver redução da atividade, do consumo de alimento e da produção em galinhas e perus.

As infecções por estirpes HPAIV causam geralmente doença hiperaguda fatal de avanço rápido, em poucas horas, com extrema prostração antes do óbito. Em grande parte dos episódios, não há observação de sinais clínicos precursores [1, 3, 58, 59, 62].

Lesões

Estirpes de baixa a moderada patogenicidade

O sistema respiratório pode ser atingido diretamente pela inalação de aerossóis. As alterações podem inicialmente concentrar-se nas pálpebras, conjuntiva ocular (blefarite, conjuntivite) e nos seios paranasais (sinusite), por infecção de aerossóis ou poeira contaminada. As lesões mais comuns são caracterizadas por inflamação catarral fibrinosa. As lesões muco ou fibrinopurulentas são comumente infectadas por bactérias. No sistema respiratório, observa-se acumulação de muco, de seroso a caseoso, na traqueia, nos bronquíolos e nos parabrônquios. Nos pulmões, a broncopneumonia fibrinopurulenta é comumente infectada por bactérias como *Escherichia coli* e *Pasteurella multocida*. Resultam em sinais clínicos, incluindo asfixia, com dispneia, estertores e espirros. No sistema disgestório, há de hiperemia a hemorragia e eventual diarreia. Em aves ratitas (Rheiformes – ema e Struthioniformes – avestruz), as infecções causam comumente conjuntivite, sinusite, traqueíte hemorrágica, aerossaculite e pneumonia intersticial com deposição de massas caseosas, por associação de infecção bacteriana [1, 3, 15, 59, 62, 63].

Em galinhas e perus, algumas estirpes de HPAIV podem causar mortalidade hiperaguda, sem a formação de lesões significativas. Outras estirpes podem provocar lesões edematosas, hemorrágicas e necróticas na pele, nos sistemas respiratório (pneumonia intersticial com edema) e digestório e em muitas vísceras.

Estirpes de alta patogenicidade

Em galinhas e perus, algumas estirpes de HPAIV podem causar mortalidade hiperaguda, sem a formação de lesões significativas. Outras estirpes podem provocar lesões edematosas, hemorrágicas e necróticas na pele, nos sistemas respiratório (pneumonia intersticial com edema) e digestório e em muitas vísceras. As hemorragias são mais destacadas na pele, no epicárdio, nos músculos peitorais, na mucosa do proventrículo e na moela. As lesões ede-

matosas na cabeça e no pescoço incluem as faces aumentadas. As estirpes de H5N1 derivadas de Hong Kong, 1997, têm causado necrose e hemorragia nas placas de Peyer (intestino delgado), similares às descritas na peste aviária do início do século XX. A maioria das estirpes causa focos de necrose no pâncreas, no baço, no coração e menos comumente no fígado e rins (com uratos). Há atrofia do timo e da bolsa cloacal. Os órgãos mais gravemente atingidos são o cérebro, coração, pulmão, pâncreas e órgãos linfoides primários e secundários. No sistema nervoso central, há gliose focal, necrose e reabsorção neuronal, com eventual edema e hemorragia. Em avestruzes, pode haver também edema na cabeça e no pescoço e grave enterite hemorrágica, com aumento rígido pancreático, aerossaculite, aumento do baço e dos rins [1, 3, 15, 59, 62, 63].

No Brasil, até o momento, não há razão para se suspeitar de AI de alta patogenicidade (HPAIV) pelas estirpes H5N1 asiáticas, uma vez que essas estirpes não chegaram ao continente americano.

Diagnóstico

No Brasil, até o momento, não há razão para se suspeitar de AI de alta patogenicidade (HPAIV) pelas estirpes H5N1 asiáticas, uma vez que essas estirpes não chegaram ao continente americano. O diagnóstico de AIV depende de confirmação laboratorial. As doenças hiperagudas e hemorrágicas de alta mortalidade mais comuns devem ser as primeiras suspeitas, incluindo envenenamentos, doença de Newcastle, pasteureloses, salmoneloses, coccidioses, e micotoxicoses. O médico veterinário deverá elencar para diagnóstico as doenças comuns na região, com base em coleta de dados em anamnese e histórico e observação clínico-patológica. Poderá haver suspeita fundamentada apenas na eventualidade de ocorrência de HPAIV nos países vizinhos, com histórico de doença que se dissemina com trajetória norte-sul, da América do Norte para a América do Sul, e o serviço de vigilância (IMA, Instituto Mineiro de Agropecuária) deverá ser chamado para a coleta de material e diagnóstico oficial.

São causas de alta mortalidade por doença edematosa e hemorrágica os envenenamentos por produtos contendo dicumarol ou seus derivados (rodenticidas), os quais se caracterizam por quadros agudos ou hiperagudos de hemorragias, tipicamente nos olhos e na cavidade oral, e podem ser confirmados por exame toxicológico (laboratorial).

Hemorragias por intoxicação aguda com micotoxinas(s) podem ser suspeita, ao se constatar a inadequada conservação de grãos ou ração, com teor de umidade superior à recomendada, baixa qualidade

dos insumos e/ou presença de artrópodos (insetos e larvas granívoras).

Doença hemorrágica pode também suscitar suspeita de intoxicação por sulfas ou derivados, com base em histórico de terapia, ou falta d'água de bebida durante a administração preventiva ou terapêutica, com mielodisplasia, nefromegalia, deposição uratos renais e tubulares, hepatotoxicidade e degeneração epitelial. Intoxicações não letais por sulfas podem permitir infecções oportunistas (granulomas bacterianos), por depressão do sistema imune, uma vez que as sulfas são tóxicas mesmo em doses terapêuticas corretas.

Ionóforos são antibióticos transportadores de íons potássio, sódio e cálcio através da membrana celular e podem, em doses tóxicas, causar paralisias, letargia, inapetência e hemorragias na gordura coronária.

As aves galináceas são muito sensíveis às intoxicações por inseticidas organofosforados, que causam paralisias, ataxia, incoordenação, letargia, cianose, convulsão e morte.

A doença de Newcastle nas formas velogênica (com até 100% de mortalidade) e mesogênica (com até 50% de mortalidade) assemelha-se nos aspectos clínico-patológicos à infecção por HPAIV. Sempre será necessário o diagnóstico laboratorial diferencial entre essas formas e as demais doenças respiratórias. Entretanto, como HPAIV asiáticos não atingiram ainda o continente americano, a suspeita deverá recair sobre a doença de Newcastle, já relatada no país.

As doenças bacterianas (pasteurelose, salmonelose) de alta mortalidade também exigem exame laboratorial, com necropsia local e coleta de órgãos resfriados (não congelados) para isolamento e caracterização bacteriana.

A coccidiose pode ser facilmente diagnosticada pela visualização em microscopia de oocistos nas fezes e/ou na mucosa intestinal.

Eliminadas as possibilidades mais comuns e com suspeita fundamentada, o diagnóstico de HPAIV é encaminhado por médico veterinário credenciado e/ou fiscal agropecuário do IMA ou do Mapa, com a coleta e o envio de materiais para laboratório.

O diagnóstico oficial é feito no Lanagro (Laboratório Nacional de Referência do Mapa), em Campinas (SP) e as recomendações legais estão publicadas [4, 5]. Para o diagnóstico de AIV, os órgãos e materiais, sua conservação e condições de envio estão descritos nos manuais publicados pelo Mapa (www.agricultura.gov.br), no PNSA. O diagnóstico molecular por análise dos produtos de PCR (após transcrição reversa) pode ser conseguido em secreções ou tecidos das aves suspeitas, com a utilização de oligonucleotídeos genéricos para influenza A em triagem e, a seguir, reações com oligonucleotídeos específicos para os principais subtipos

(H5 ou H7), com o sequenciamento da região de clivagem da glicoproteína F, para a determinação da virulência. O gene que codifica a região de clivagem glicoproteína da fusão tem código para múltiplos aminoácidos básicos arginina e/ou lisina.

A caracterização da virulência da estirpe pode ser determinada por inoculação intravenosa de frangas SPF, de forma semelhante à caracterização de AMPV-1, com a demonstração, em oito dias de observação, de sinais respiratórios, depressão, diarreia, cianose de crista ou barbela, edema da face e/ou cabeça, sinais nervosos e morte em pelo menos 75% das aves inoculadas. As aves inoculadas que se tornam moribundas podem ser sacrificadas, e a elas pode ser dado escore 3. Índice médio acima de 1,2 e até 3 indica alta patogenicidade da estirpe viral, e índice abaixo de 1,2 indica baixa patogenicidade [1, 3, 4, 5].

Tendo em vista a probabilidade de aves migratórias participarem do processo de chegada da infecção, acredita-se que, primeiramente, haveria a mortalidade de aves de praia e outras da fauna. Por essa razão, a vigilância ativa faz monitoramento programado dessas aves.

Os detalhes da coleta e da remessa de material estão publicados no manual do Mapa [4, 5]. Em casos com suspeita, recomenda-se a necropsia e a coleta de tecidos na granja, com o objetivo de reduzir a disseminação do agente [4, 5]. Os tecidos para isolamento viral e PCR devem ser congelados para o envio, separados por tipo de tecido em sacos plásticos fechados. Os tecidos para histopatologia são conservados em uma parte de tecido para 10 partes de formol tamponado (formol a 10% em salina tamponada-PBS). Para estirpes de HPAIV, todos os tecidos podem conter o vírus e podem ser enviados para detecção molecular do RNA de AIV, preferencialmente do sistema nervoso central, dos sistemas respiratório e digestório, removidos nessa ordem, para PCR e para histopatologia. Para estirpes de LPAIV (casos de baixo impacto clínico), é importante o envio do sistema respiratório e de suas portas de entrada (pálpebras, conjuntiva ocular, laringe, traqueia, pulmão).

Os detalhes da coleta e remessa de material estão publicados no manual do Mapa em: http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Animal_Health_in_the_World/docs/pdf/PLANO_DE_CONTINGÊNCIA_VERS_C3O_1.3_JULHO_2009.PDF

Após a eutanásia e a necropsia de aves observadas vivas, devem ser recolhidos sangue (e separado o soro), sua-

be cloacal e de traqueia e fezes frescas. Aves encontradas mortas devem também ser necropsiadas, e recolhidos o baço, o cérebro, o coração, as fezes, o fígado, o humor aquoso, o intestino, o proventrículo, o pulmão e a traqueia, os sacos aéreos e o suabe da orofaringe. Esses tecidos devem ser recolhidos em sacos plásticos novos, fechados e acomodados em caixa isotérmica com gelo reciclável (imediatamente retirado de *freezer* -20). As amostras devem ser divididas em duplicatas no laboratório [4, 5].

Para a OIE e a OMS, o médico veterinário é o principal ator no controle das emergências sanitárias de aspecto zoonótico.

Prevenção e controle

No Brasil, a vigilância de HPAIV e de outras viroses exóticas tem sido executada, em ação conjunta, pelo Mapa, Ibama e Ministério da Saúde, em aves migratórias. Nos plantéis avícolas industriais, o PNSA determina a monitoração e os procedimentos para a atuação na erradicação de foco, tanto em infecções subclínicas quanto em infecções suaves por LPAIV ou em doença por HPAIV [4, 5]. A preparação da infraestrutura para a contingência (algo que pode acontecer ou que não se sabe se poderá acontecer ou não) de influenza é condição essencial para o enfrentamento do AIV e exigida pelos organismos internacionais (World Organization for Animal Health – OIE e World Trade Organization – WTO, para os países exportadores de produtos avícolas como o Brasil). Para a OIE e a OMS (Organização Mundial de Saúde), o médico veterinário é o principal ator no controle das emergências sanitárias de aspecto zoonótico, incluindo as contribuições para o bem-estar físico, mental e social dos seres humanos, pelo conhecimento e consequente aplicação da ciência veterinária.

No país, nenhuma outra estratégia é permitida, exceto a erradicação para AIV de plantéis industriais. Em outros países, como China, México e Rússia, adotou-se a vacinação de galinhas para a proteção de plantéis avícolas. A vacinação pode ser satisfatória na prevenção da doença, mas apenas contra estirpe homóloga, reduzindo a produção de vírus em aves desafiadas. Entretanto, pode significar a manutenção de população avícola com resistência à expressão de doença clínica e portadora de vírus de risco à saúde pública (humana).

A legislação sanitária brasileira proíbe a utilização de vacina contra a influenza aviária em aves.

A legislação sanitária determina que a mortalidade acima de 10% na granja e acima de 1% no transporte exige a notificação e o diagnóstico laboratorial da(s) causa(s). As normas determinam também ênfase em bios-

seguridade, controle de trânsito e proibição do comércio de aves vivas [4, 5].

Vacinação

A legislação sanitária brasileira proíbe a utilização de vacina contra a influenza aviária em aves [4, 5]. No entanto, para a contenção de foco, está previsto o uso de vacina na zona de proteção e vigilância (raio de 10km do foco), caso seja necessário e mediante análise técnica do DSA/Mapa. O serviço veterinário oficial leva em consideração [4, 5]:

- concentração de aves na área afetada;
- característica e composição da vacina a ser utilizada;
- registro, aquisição e procedimentos para estoque, distribuição e controle do uso da vacina;
- espécies e categorias de aves que serão submetidas à vacinação.

Referências

1. Alexander DJ, Brown IH. History of highly pathogenic avian influenza. Revue Scientifique et Technique: International Office of Epizootics 2009;28(1): 19-38.

2. Anvisa. Simulado de influenza aviária envolve três estados [cited 2012 abr 06]. Notícias Anvisa, 27 jun 2007. Available from: http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2007/270607_1.htm#.

3. Avian Influenza. Chapter 2. 3. 4. OIE (2008). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Disponível em: http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/

4. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Plano de contingência para influenza aviária e doença de Newcastle. 2009. Disponível em: http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Animal_Health_in_the_World/docs/pdf/PLANO_DE_CONTINGÊNCIA_VERS_C3O_1.3_JULHO_2009.PDF

5. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Manual de Legislação. Programas Nacionais de Saúde Animal do Brasil. 2009. 441 pp. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Aniamal/Manual%20de%20Legisla%C3%A7%C3%A3o%20-%20Sa%C3%BAde%20Animal%20-%20low.pdf

6. Capua I, Marangon, S. The avian influenza epidemic in Italy, 1999-2000: A review. Avian Pathology 2000; 29:289-294.

7. Capua I, Mutinelli F, Pozza, D, Donatelli M, Puzelli IS, Cancellotti MF. The 1999–2000 avian influenza (H7N1) epidemic in Italy: veterinary and human health implications. Acta Tropica 2002; 83(1):7-11.

8. Cauthern AN, Swayne, DE, Schultz-Cherry, S, Perdue, ML, Suarez, DL. Continued circulation in China of highly pathogenic avian influenza viruses encoding the hemagglutinin gene associated with the 1997 H5N1 outbreak in poultry and humans. Journal of Virology 2000; 74(14): 6592-6599.

9. CDC - Centers for disease control and prevention. 2009 H1N1 Flu: situation update [cited 2010b Jun 03]. Available from: http://www.cdc.gov/h1n1flu/update.htm.

10. CEMAVE. Centro Nacional de Pesquisa para Conservação das Aves Silvestres. LISTA DAS ESPÉCIES DE AVES MIGRATÓRIAS OCORRENTES NO BRASIL. ICMBio - Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. http://www.icmbio.gov.br/portal/quem-somos/o-instituto.html

11. Chen R, Holmes EC. Frequent inter-species transmission and geographic subdivision in avian influenza viruses from wild birds. Virology 2009; 383(1):156-161.

12. Chen W, He B Li C, Zhang X, Wu W, Yin X. Real-time RT-PCR for H5N1 avian influ-

enza A virus Detection. Journal of Medical Microbiology 2007; 56, 603-607.

13. Chen Y, Xu F, Gui X, Yang K, Wu X, Zheng Q. A rapid test for the detection of influenza A virus including pandemic influenza A/H1N1 2009. Journal of Virological Methods 2010; 167(1):100-102.

14. Coiras MT, Pérez-Breña P, García ML, Casas I. Simultaneous detection of influenza A, B, and C viruses, respiratory syncytial virus, and adenoviruses in clinical samples by multiplex reverse transcription nested-PCR assay. Journal of Medicine Virology 2003; 69(1):132-44.

15. Condit RC. Principles of virology. In: Knipe DM, Howley PM. Fields virology. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007.

16. Dawood FS, Jain S, Finelli L, Shaw MW, Lindstrom S, Garten RJ, Gubareva LV, Xu X, Bridges, CB, Uyeki TM. Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans. New England Journal of Medicine 2009; 360:2605-2615.

17. De Jong JC, Rimmelzwaan GF, Fouchier RA, Osterhaus AD. Influenza virus: a master of metamorphosis. Journal of Infection 2000; 40:218-228.

18. Domingo, E. Virus Evolution. In: Knipe DM, Howley PM, Chapter 12. editors. Fields virology. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007.

19. Eigen M, McCaskill J, Schuster P. Molecular quasi-species. Journal of Physical Chemistry 1998; 92(24):6881-6891.

20. EPA. U.S. Environmental Protection Agency. Registered antimicrobial products with label claims for avian (bird) flu disinfectants. 2007 [cited 2012 Mar 13]. Available from: http://www.epa.gov/pesticides/factsheets/avian_flu_products.htm.

21. European Commission, Health & Consumer Protection Directorate-General, Directorate C - Scientific Health Opinions, Unit C3 - Management of scientific committees II, The Definition of Avian Influenza, The use of Vaccination against Avian Influenza, Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare, Adopted 27 June 2000 [cited 2010 Jun 4]. Available from: http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scah/out45-final_en.pdf.

22. FAO - Food and Agriculture Organization. Avian influenza vaccine producers and suppliers for poultry; 2009 [cited 2012a April 06]. Available from: ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/011/ai326e/ai326e00.pdf.

23. FAO - Recommendations on the Prevention, Control and Eradication of Highly Pathogenic Avian Influenza (HPAI) in Asia, September 2004 [cited 2012b April 06]. Available from: http://www.fao.org/docs/eims/upload/165186/FAOrecommen dationsonHPAI.pdf.

24. FAO -Food and Agriculture Organization. Preparing for highly pathogenic avian influenza, 2007 [cited 2012c april 06]. Available from: ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/012/i0808e/i0808e.pdf.

25. Fauquet C, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA, editors. Virus taxonomy: VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. London: Elsevier Academic Press; 2004.FDA - US Food and Drug Administration. Medical devices and flu emergencies 2010 [cited 2012 April 06]. Available from: http://www.fda.gov/MedicalDevices/Safety/EmergencySituations/ucm161496.htm.

26. Fouchier RAM, Bestebroer TM, Herfst S, van der Kemp L, Rimmelzwaan GF, Osterhaus ADME. Detection of Influenza A viruses from different species by PCR amplification of conserved sequences in the matrix gene. Journal of Clinical Microbiology 2000; 38 (1): 4096-4101.

27. Gaidet, N., Dodman, T., Caron, A., Balança, G., Desvaux, S., Goutard, F., et al., Avian Influenza Viruses in Water Birds, Africa. Emerging Infectious Diseases 2007, 13(4), 626–629. doi:10.3201/eid1304.061011.

28. Golono MA. Epidemiologia e caracterização molecular de virus da influenza em aves resi-

dentes e migratórias no Brasil [tese]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo; 2009. 102 p.

29. Hoelscher MA, Garg S, Bangari DS, Belser JA, Lu X, Stephenson I, et al. Development of adenoviral-vector-based pandemic influenza vaccine against antigenically distinct human H5N1 strains in mice. The Lancet 2006; 367(9509):475-481.

30. Jackson S, Van Hoeven N, Chen LM, Maines TR, Cox NJ, Katz JM, Donis RO. Reassortment between avian H5N1 and human H3N2 influenza viruses in ferrets: A public health risk assessment. Journal of Virology 2009; 83(16): 8131-8140.

31. Jia N, Wangb S-X, Liud Y-X, Zhanga P-H, Zuoa S-Q, Zhana L, et al. Increased sensitivity for detecting avian influenza-specific antibodies by a modified hemagglutination inhibition assay using horse erythrocytes. Journal of Virological Methods 2008; 153:43-48.

32. Kendal AP, Goldfield M, Noble GR, Dowdle WR. Identification and preliminary antigenic analysis of swine influenza-like viruses isolated during an influenza outbreak at Fort Dix, New Jersey. Journal of Infectious Diseases 1997; 136 (suppl): 381-385.

33. Klenk HD, Rott R, Orlich M, Blodorn J. Activation of influenza A viruses by trypsin treatment. Virology 1975; 68:426-439.

34. Knossow M, Gaudier M, Douglas A, Barrère B., Bizebard T., Barbey C., et al. Mechanism of neutralization of influenza virus infectivity by antibodies. Virology 2002; 302(2):294-298.

35. Krauss S, Obert CA, Franks J, Walker D, Jones K, Seiler P, et al. Influenza in migratory birds and evidence of limited intercontinental virus exchange. PLoS Pathogens 2007 3(11):e167. Available from: http://www.plospathogens.org.

36. Lam TY, Pybus OG, Hon CC, Leung FC. Molecular epidemiology of H5N1 Avian Influenza Virus: Correlations between antigenic drift, geographical migration and expansion of viral diversity. Proceedings of the 13th International Congress on Infectious Diseases; 2008; Hong Kong: Beijing International Convention Center; 2008. p. 58-59.

37. Lee CW, Senne DA, Suarez DL. Effect of vaccine use in the evolution of Mexican lineage H5N2 avian influenza virus. Journal of Virology 2004; 78(15):8372-81.

38. Lénès D, Deboosere N, Menard-Szczebara F, Jossent J, Alexandre V, Machinal C, Vialette M. Assessment of the removal and inactivation of influenza viruses H5N1 and H1N1 by drinking water treatment. Water Research 2010; 44:2473-2486.

39. Marakova NV, Kaverin NV, Krauss S, Senne D, Webster R.G. Transmission of Eurasian avian H2 influenza virus to shore birds in North America. Journal of General Virology 1999; 80: 3167-3171.

40. Marjuki H, Wernery U, Yen HL, Franks J, Seiler P, Walker D, et al. Isolation of highly pathogenic avian influenza H5N1 virus from Saker falcons (Falco cherrug) in the Middle East. Advances in Virology 2009; doi:10.1155/2009/294520.

41. Martins, N.R.S. Influenza aviária: uma revisão dos últimos dez anos. Revista Brasileira de Ciência Avícola 2001; 3:97-140.

42. Martins, N.R.S. An overview on avian influenza. Rev. Bras. Ciência Avícola, Campinas, v.14, n.2, June 2012. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-635X2012000200001&lng=en&nrm=iso>. access on 07 Feb. 2015. http://dx.doi.org/10.1590/S1516-635X2012000200001.

43. Messias EL, Cordeiro NF, Sampaio JJ, Bartko JJ, Kirkpatrick B. 2001. Schizophrenia and season of birth in a tropical region: relation to rainfall. Schizophrenia Research 48:227-234.

44. Murphy, B.R.; Webster, R.G. 1996. Orthomyxoviruses. In: Fields Virology, Editores B.N. Fields, D.M. Knipe, P.M. Howley et al., Lippincott – Raven Publishers, Philadelphia, p. 1397-1445.

45. OIE - Office International des Epizooties. World Organization for Animal Health. Outbreaks of highly pathogenic avian influenza. Available from: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal_Health_in_the_

World/docs/pdf/-graph_avian_influenza/graphs_HPAI_11_03_2012.pdf

46. OIE - The World Organization for Animal Health. Prevention and control of animal diseases worldwide, economic analysis – prevention versus outbreak costs. Asford: Agra CEAS Consulting; 2007. p. 238.

47. OIE - Wahid Interface - Animal Health Information. 2015 http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/WI#

48. Palese P, Shaw ML. Orthomyxoviridae: the viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM, editors. Fields virology. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007.

49. Permin A, Detmer A. Improvement of management and biosecurity practices in smallholder poultry producers 2007. FAO: Husbandry Management Practices and Biosecurity [cited 2009 April 21]. Available from: http://www.fao.org/docs/eims/upload/228410/biosecurity_en.pdf.

50. Pisareva M, Bechtereva T, Plyusnin A, Dobretsova A, Kisselev O. PCR-amplification of influenza A virus specific sequences. Archives of Virology 1992; 125: 313-318.

51. Riner A, Chan-Tack KM, Murray JS. Intravenous Ribavirin - Review of the FDA's Emergency Investigational New Drug Database (1997-2008) and Literature Review. Postgraduate Medicine 2009; 121: 139-146.

52. Römer-Oberdörfer A, Veits J, Helferich D, Mettenleiter TC. Level of protection of chickens against highly pathogenic H5 avian influenza virus with Newcastle disease virus based live attenuated vector vaccine depends on homology of H5 sequence between vaccine and challenge virus. Vaccine 2008; 26(19):2307-2313.

53. Rutala WA, Weber DJ. The healthcare infection control practices advisory committee (HICPAC). Clifton: Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities; 2008.

54. Secretaria de Estado da Saúde. Situação epidemiológica da influenza pandêmica (H1N1) 2009, Influenza Aviária H5N1 e vigilância sentinela da influenza, estado de São Paulo, Brasil. São Paulo (Brasil); 2011. Informe Técnico [cited 2012 March 23]. Available from: http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/- resp/pdf/IF11_INFLU300811.pdf.

55. Soebiyanto RP, Clara W, Jara J, Castillo L, Sorto OR, et al. The Role of Temperature and Humidity on Seasonal Influenza in Tropical Areas: Guatemala, El Salvador and Panama, 2008–2013. PLoS ONE 2014 9(6): e100659. doi:10.1371/journal.pone.0100659.

56. Spackman E, Senne DA, Myers TJ, Bulaga LL, Garber LP, Perdue ML, Lohman K, Daum LT, Suarez DL. Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes. Journal of Clinical Microbiology 2002; 40: 3256-3260, 2002.

57. Stallknecht DE, Shane SM, Kearney MT, Zwank PJ. Persistence of avian influenza viruses in water. Avian Diseases 1990; 34(2):406-411.

58. Starick E, Römer-Oberdörfer A, Werner O. Type- and subtype-specific RT-PCR assays for avian influenza A viruses (AIV). Journal of Veterinary Medicine 2000 b; 47: 295-301.

59. Suarez, D.L. Evolution of avian influenza viruses. Veterinary Microbiology, v. 74, no. 1-2, p.15-27, 2000.

60. Subbarao K, Klimov A, Katz J, Regnery H, Lim W, Hall H, et al. Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness. Science 1998; 279 (5349): 393-396.

61. Swayne DE, Beck JR, Kinney N. Failure of a recombinant fowlpox vaccine containing an avian influenza hemagglutinin gene to provide consistent protection against influenza in chickens preimmunized with a fowl pox vaccine. Avian Diseases 2000a; 44:132-137.

62. Swayne DE, Halvorson DA. Influenza. In: Saif et al, editor. Diseases of poultry. Ames: Blackwell Publishing; 2008. p. 153-184.

63. Swayne DE, Pantin-Jackwood M. Pathogenicity of avian influenza viruses in

poultry. Developmental Biology (Basel) 2006; 124:61-67.

64. Swayne DE. Understanding the complex pathobiology of high pathogenicity avian influenza viruses in birds. Avian Diseases 2007; 51 (1 Suppl): 242-9.

65. UBABEF. União Brasileira de Avicultura. Relatório anual 2014. São Paulo, 2014. Disponível em: < http://www.ubabef.com.br/files/publicacoes/8ca705e70f0cb110ae3aed67d29c8842.pdf>. Acesso em 8 fev. 2015.

66. USC - University of South Carolina. Environmental health & safety.pandemic influenza cleaning & disinfection [cited 2011 April 10]. Available from: http://ehs.sc.edu/hazwaste/environmental.htm.

67. USGS. An Early detection system for highly pathogenic H5N1 avian influenza in wild migratory birds U.S. interagency strategic plan [cited 2006 Mar 3]. Available from: http://alaska.usgs.gov/science/-biology/avian_influenza/pdfs/Final_Wild_Bird_Stategic_Plan_3-17a.pdf.

68. Veits J, Wiesner D, Fuchs W, Hoffmann B, Granzow H, Starick E, et al. Newcastle disease virus expressing H5 hemagglutinin gene protects chickens against Newcastle disease and avian influenza. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 2006; 103(21):8197-8202, 2006.

69. WHO. Regional Office for South-East Asia. Why are we concerned now? 2009a.WHO. Regional Office for South-East Asia. Influenza pandemic of last century: some lesson; 2009b. WHO. World Health Organization. Avian influenza: responding to the pandemic threat [cited 2010 Fev 10]. Available from: http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelinestopics/en/index.html.

70. WHO. World Health Organization. Avian influenza: responding to the pandemic threat [cited 2010 Dec 10]. Available from: http://www.searo.who.int.

71. WHO. World Health Organization. Cumulative number of confirmed human cases of avian influenza A(H5N1) reported to WHO. Available from: http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/EN_GIP_20150106CumulativeNumberH5N1cases_corrected.pdf?ua=1.

72. WHO. World Health Organization. Influenza at the human-animal interface (HAI) [cited 2010 fev 27]. Available from: http://www.who.int/csr/disease/en.

73. Wright PF, Neumann G, Kawaoka Y. Orthomyxoviruses. In: Knipe DM, Howley PM, editors. Fields virology. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. chapter 48.

74. Writing Committee of the Second World Health Organization Consultation on Clinical Aspects of human infection with avian influenza A (H5N1) Virus. In: Abdel-Ghafar AN, Chotpitayasunondh T, ZGao Z, Hayden FG, Nguyen DH, de Jong MD, et al. *Update* on avian Influenza A (H5N1) virus Infection in Humans. The New England Journal of Medicine 2008; 358(3):261-273.

2. Doença de Newcastle

bigstockphoto.com

Nelson Rodrigo da Silva Martins[1] *- CRMV-MG 4809*
Roselene Ecco[2] *- CRMV MG 8324*
[1.] *Professor Associado, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, EV, UFMG.*
[2.] *Professor Associado, Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias, EV, UFMG.*

Introdução

A doença de Newcastle (DN) tem controle oficial pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Brasil 2099 a, b), no Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA). Nos estados, sob a coordenação do MAPA, os Institutos Estaduais de Agropecuária (em Minas Gerais, o IMA) são os atores do PNSA. A DN é exótica na avicultura industrial brasileira e eventuais focos devem ser erradicados, conforme as recomendações da Organização Mundial de Saúde Animal, para que o país esteja em conformidade para exportação [25].

A DN é possivelmente a mais devastadora entre as doenças da criação industrial de aves [31]. A ocorrência de um surto de DN acarreta elevadas perdas econômicas ao país atingido. Em razão deste impacto, e tendo em vista que a conformidade para o comércio internacional, exigem-se aos países signatários, a erradicação e a condição de

livre das estirpes causadoras de doença [25]. A DN é considerada a doença de maior impacto econômico entre todas as doenças de animais, pelas despesas com erradicação, custos com enfrentamento de surtos e perdas de mercados durante a interdição [1].

Em galinhas susceptíveis o surto de doença de Newcastle pode ser extremamente grave, 100% das aves afetadas podem morrer desde as primeiras horas de infecção e em até 72 horas sem apresentar sinais clínicos evidentes.

Etiologia

A DN é causada por um vírus da família *Paramyxoviridae*, subfamília *Paramyxovirinae* [Brown et al., 1999] e gênero *Avulavirus* [16], classificado como paramixovirus aviário 1 (APMV-1, *Avian Paramyxovirus 1* - paramixovirus aviário 1). APMV-1 é a única etiologia da doença de Newcastle. Há no total nove sorotipos descritos de *Paramyxovirus* aviários, designados APMV-1 a APMV-9. Ocasionalmente, patologias em aves domésticas foram também descritas com estirpes de vírus dos sorotipos APMV-2, APMV-3, APMV-6, e APMV-7. Entretanto, APMV-1 o de maior importância e ocorrência [11]. Em galinhas susceptíveis o surto de doença de Newcastle pode ser extremamente grave, 100% das aves afetadas podem morrer desde as primeiras horas de infecção e em até 72 horas sem apresentar sinais clínicos evidentes. A DN integra a lista de doenças infecciosas de notificação obrigatória da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE - Office Internacional des Epizooties) [25], que reúne as doenças, cujas consequências socioeconômicas podem ser graves e de grande importância econômica no comércio internacional de aves e seus produtos. As suspeitas devem ser encaminhadas para diagnóstico laboratorial e são de notificação compulsória (obrigatória) em todos os países signatários e integrados à Organização Mundial do Comercio [25].

A DN é uma zoonose da classe 2, com infecção humana por quaisquer estirpes, incluindo estirpes vacinais. Entretanto, a infecção geralmente não é grave, embora possa requerer controle de infecção bacteriana oportunista. Entretanto, não há relato da transmissão entre seres humanos. A doença em humanos ocorre geralmente em funcionários de frigoríficos de aves, laboratoristas e vacinadores que aplicam a vacina com o vírus vivo e sem máscara de proteção. O período de incubação em humanos é de 24 horas e o quadro clínico consiste em conjuntivite com hiperemia, lacrimejamento, edema das pálpebras e hemorragia. Apesar de a infecção da conjuntiva poder resultar em efeitos graves, em geral a infecção é transiente e a córnea não é afetada [1]. Entretanto,

há relato de um caso de infecção pulmonar grave e fatal com APMV-1 em paciente imunodeprimido [12].

A evolução das estirpes de APMV-1 ocorre a partir de mutações na região de clivagem da glicoproteína de fusão (F). Estirpes patogênicas emergem de não-patogênicas por mutação no código genético para presença de aminoácidos básicos no sítio de clivagem de F (resíduos 111-116 e fenilalanina em 117). Por muitos anos pensou-se haver aves na condição de reservatórios assintomáticos de estirpes patogênicas, mas isto não se confirmou cientificamente. As evidências científicas da mutação em F para maior patogenicidade foram demonstradas em episódios de doença de Newcastle na Austrália [20, 40].

Por muitos anos pensou-se haver aves na condição de reservatórios assintomáticos de estirpes patogênicas, mas isto não se confirmou cientificamente.

Os isolados de APMV-1 podem ser classificados como velogênicos, mesogênicos e lentogênicos, de acordo com a virulência para embriões, pintinhos ou franguinhas [1]. As estirpes velogênicas são altamente patogênicas e podem resultar em 100% de mortalidade em aves de qualquer idade, com a caracterização, quanto ao tropismo, em viscerotrópicas (hemorragias gastrointestinais e diarreia) ou em neurotrópicas (lesões no sistema nervoso central e sinais nervosos). Estirpes mesogênicas causam lesões respiratórias moderadas, raramente neurológicas e resultam em baixa mortalidade e até mediana mortalidade. As estirpes lentogênicas, apesar de pouco virulentas e usadas como vacinas, podem determinar infecções secundárias e diminuição da produção de carne e ovos [1, 8].

A caracterização de APMV-1 pode ser obtida por inoculação experimental em aves SPF: Embriões, pintinhos e ou franguinhas. As estirpes causadoras de doença apresentam virulência superior a 0,7 para o índice de patogenicidade intracerebral (IPIC) em pintinhos SPF de 1 dia de idade [1, 6, 7, 25].

As estirpes patogênicas têm múltiplos aminoácidos básicos no sítio de clivagem da glicoproteína da fusão, com os aminoácidos Arginina ou Lisina nas posições 113-116 e Fenilalanina na posição 117 (fórmula 113RXR/KR*F117 – 113Arginina, 114Glutamina/qualquer, 115Arginina/Lisina, 116Arginina e

As estirpes patogênicas têm múltiplos aminoácidos básicos no sítio de clivagem da glicoproteína da fusão, com os aminoácidos Arginina ou Lisina nas posições 113-116 e Fenilalanina na posição 117.

117Fenilalanina) [1, 25]. Esta composição é necessária para a ativação enzimática, que ocorre intracelular por furina do complexo de Golgi. A proteína F0 recém formada, é ativada em F1 e F2 pela furina, e permite infectividade aos novos vírions que emergem da célula, procederem a fusão e penetração. Mecanismo semelhante ocorre com as estirpes patogênicas do vírus de influenza aviária (HPAIV). As estirpes não patogênicas (lentogênicas) não possuem esta composição e por isto não são ativadas no complexo de Golgi, não emergindo infectantes da célula.

APMV-1 tem um amplo espectro de hospedeiros, ocorrendo em pelo menos 247 espécies de aves, em 27 das 50 ordens de aves conhecidas, incluindo todas as espécies domésticas e muitas silvestres e semi-silvestres ou criadas em cativeiro, infectadas natural ou experimentalmente.

As diferenças em patogenicidade residem principalmente na clivagem ou não da glicoproteína da fusão, ativação que permite a fusão do vírus à célula. APMV-1 é envelopado e depende da integridade do envelope para promover a adsorção e penetração na célula alvo. A infecciosidade é destruida por detergentes e desinfetantes (formol, cresol, hipoclorito de sódio, iodo, quaternário de amônia, etc.), comumente empregados na avicultura, embora haja reduzida eficiência desinfetante quando protegidos por matéria orgânica. As estirpes de APMV-1 naturalmente não patogênicas (lentogênicas) têm IPIC < 0,7 e têm sido usadas como vacinas vivas e inativadas no Brasil e em todo o mundo. A infecção não resulta em doença, exceto em condições de baixa higiene e/ou baixa renovação/baixa qualidade do ar [1,25].

Epidemiologia

A transmissão da DN é horizontal, direta de ave doente ou portadora para ave susceptível, com a inalação de aerossóis respiratórios ou das fezes, ou indireta por utensílios, alimento ou pessoal contaminado. Humanos sem proteção prévia são susceptíveis à conjuntivite por NDV e transmitem vírus. As aves da ordem Anseriformes (pato, ganso) infectam-se, mas são mais resitentes à manifestação de doença, sendo por isto importante fator de risco para aves galináceas. As aves da ordem Galliformes (galinha, peru, faisão, pavão) estão entre as mais sensíveis [1, 25].

APMV-1 tem um amplo espectro de hospedeiros, ocorrendo em pelo menos 247 espécies de aves, em 27 das 50 ordens de aves conhecidas, incluindo todas as espécies domésticas e muitas silvestres e semi-silvestres ou criadas em cativeiro, infectadas natural ou experimentalmente [19]. Destaca-se a complicada epidemiologia, com muitas

espécies potenciais fontes de APMV-1, condição que exige extremo rigor em biosseguridade e ou imunoproteção para as criações de galinhas, perus e outras aves da indústria avícola.

As aves da ordem Columbiformes podem ser infectadas com estirpes de APMV-1 próprias, designados paramixovirus dos pombos (*pigeon paramyxovirus* 1, PPMV-1), mas são também suscetíveis a infecção por estirpes de galinhas [31]. PPMV-1 também causa lesões graves em galinhas infectadas, especialmente atingindo o coração e encéfalo. Os pombos domésticos (*Columba livia*) devem ser considerados como fonte potencial de APMV-1 e de risco para criações comerciais [21]. Anticorpos monoclonais para a hemaglutinina foram usados para tipificar as estirpes de APMV-1 de pombos, responsáveis por surtos de DN em galinhas no Reino Unido em 1984 [2, 30].

Da mesma forma, algumas espécies de aves selvagens podem ser importantes na disseminação do vírus da doença de Newcastle [4]. A eliminação do vírus pode ocorrer durante um ano em papagaios verdadeiros (*Amazona aestiva*) e por cerca de 80 dias por canário (*Serinus canária*), periquito australiano (*Melopsittacus undulatus*), mynah comum (*Gracula religiosa*) e manon-de-cabeça-negra (*Lonchura atricapilla*) [31]. Equipes de vacinação que transitam entre granjas foram implicadas em surtos de DN [Utterbach]. Surtos foram também relatados por inativação incompleta de vacinas inativadas [36] e a contaminação de vacinas [18].

Durante o curso da infecção por uma estirpe velogênica do VDN, a maioria das aves excreta grande quantidades de vírus nas fezes, que se constituem no principal meio de disseminação do vírus da doença de Newcastle de ave para ave. O vírus da doença de Newcastle (VDN) possui a capacidade de se difundir por todo o mundo por meio de aves suscetíveis, pessoas, equipamentos, ar, ração, água contaminada, vacinas, veículos e até por espécies não aviárias, entre as quais, pequenos roedores e insetos [1].

A transmissão do vírus ocorre pelo contato com produtos como ração ou utensílios (bebedouros, comedouros) contaminados, ou por aerossóis de fezes ou produzidos na respiração de aves infectadas. A infecção pode ocorrer pela inalação do vírus excretado por aves com sinais respiratórios. A replicação intestinal resulta em maior amplitude de contaminação, por exemplo, da água e alimentos, sendo importantes fontes de infecção [1].

Ocorrência mundial

O primeiro surto da doença ocorreu em 1926, em Java, na Indonésia e em Newcastle, na Inglaterra. No entanto, alguns autores reconhecem que surtos anteriores podem ter ocorrido na Europa Central, Coréia e ilhas no oeste da Escócia [1].

Mesmo com as medidas de biosseguridade e vigilância sanitária, ainda há surtos que ocorrem em todo o mundo, por exemplo, no México (fevereiro de 2006), Azerbaijão (fevereiro de 2006), Ucrânia (fevereiro de 2006), Japão (maio de 2006), França (novembro de 2006), Brasil (novembro de 2006), Suíça (novembro de 2006), Latvia (novembro de 2006), Reino Unido (novembro de 2006), Itália (dezembro de 2006), Sérvia e Montenegro (dezembro de 2006), Turquia (dezembro de 2006), Bulgária (dezembro de 2006), Romênia (dezembro de 2006), Bangladesh (junho de 2007), Congo (janeiro e junho de 2007), Grécia (junho e dezembro de 2007), Guinea (julho e dezembro de 2007), Malásia (julho de 2007), Filipinas (dezembro de 2007), África do Sul (julho e dezembro de 2007), México (julho e dezembro de 2007), Bulgária (fevereiro e março de 2008), Romênia (fevereiro e março e abril de 2008), Alemanha (abril de 2008), Suécia (abril de 2008), Chile (maio de 2008), Finlândia (junho de 2008), Eslováquia (julho de 2008), Itália (julho de 2008), Finlândia (julho de 2008), Peru (setembro de 2008), Peru (setembro de 2008), Suécia (novembro de 2008), Belize no Caribe (novembro de 2008), Bulgária (dezembro de 2008), Suécia (dezembro de 2008), Japão (dezembro de 2008) e Belize no Caribe (dezembro de 2008) [25]. As ocorrências mundiais no segundo semestre de 2014 estão destacadas no mapa de distribuição publicado pela OIE [25] (Fig. 1).

Ocorrência no Brasil

No Brasil, a DN teve o primeiro relato de surto em Belém (PA) e Macapá (AP), em 1953 [33], com a suspeita de importação de carcaças congeladas de aves de corte procedentes dos Estados Unidos da América, para um dos hotéis da capital paraense [38] e isolamento da estirpe M33 [9]. A partir desta data, a doença foi observada em todo o território nacional, ocasionando graves perdas econômicas à avicultura [15]. Nos anos seguintes foram assinalados vários surtos em aves reprodutoras, comerciais, criadas em galinheiros domésticos e/ou em aves caipiras [3, 9, 27, 34]. Os episódios resultaram em elevados prejuízos à avicultura nacional, incluindo o comprometimento do comércio internacional de produtos de origem avícola.

No Brasil, a DN teve o primeiro relato de surto em Belém (PA) e Macapá (AP), em 1953 [33], com a suspeita de importação de carcaças congeladas de aves de corte procedentes dos Estados Unidos da América, para um dos hotéis da capital paraense [38] e isolamento da estirpe M33 [9].

No Brasil, desde

1994 está em vigor, instituído pelo MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) o Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA), que estabelece normas de biossegurança, vacinação e sacrifício de aves com confirmação laboratorial de estirpes patogênicas de APMV-1, em todas as regiões avícolas [6, 7]. Desde 1997, não foram relatados surtos em criatórios comerciais. Em 1997, foram descobertas estirpes virulentas de APMV-1 em avestruzes importados (São Paulo), no Paraná em pássaros exóticos também importados. Os surtos mais recentes ocorreram em galinhas e patos de fundo de quintal foram notificados no Rio de Janeiro e Goiás, em 2000 e 2001, respectivamente, e em 2006 no Rio Grande do Sul, Amazonas, Mato Grosso [26] e novo surto no Amazonas em 2008 [29].

Em 7 de abril de 2006, o MAPA, pela Instrução Normativa nº 17, resolve aprovar (com fundamento na Portaria Ministerial nº 193, de 19 de setembro de 1994, e o que consta do Processo no 21000.001074/2006-37), no âmbito do Programa Nacional de Sanidade Avícola, o Plano Nacional de Prevenção da Influenza Aviária e de Controle e Prevenção da Doença de Newcastle [6, 7]. Contudo, a rota de aves migratórias no Estado do Maranhão, foi incluída na vigilância do PNSA, com a Instrução

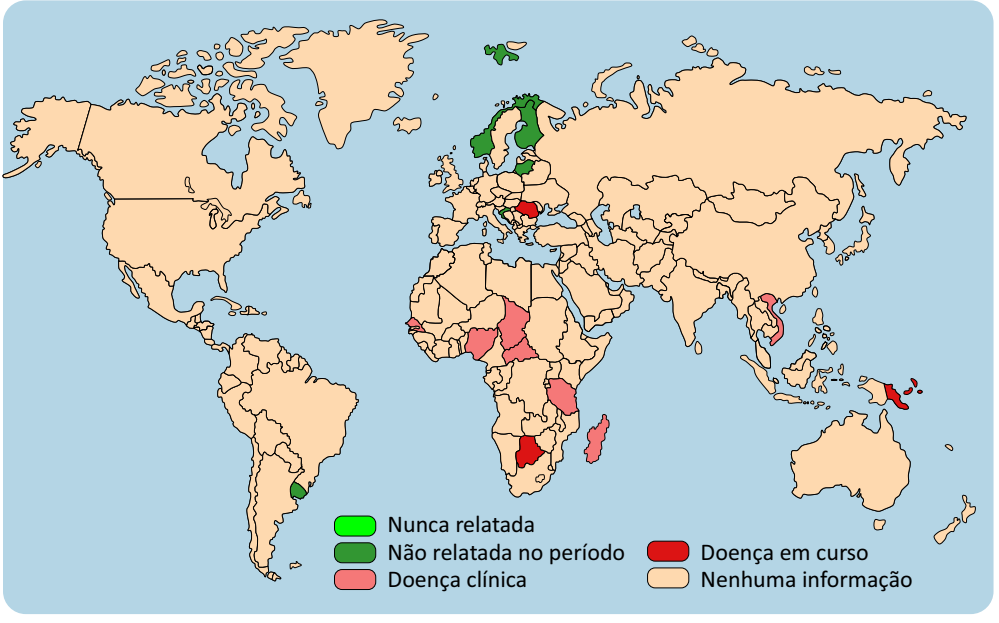


Fig. 1. Ocorrências de doença de Newcastle no segundo semestre de 2014. Com exceção da Romênia (Europa), os demais países em vermelho concentram-se no continente africano e asiático. World Animal Health Information Database (WAHID) – Version 1. Copyright © World Organisation for Animal Health (OIE), [25], Acesso em 08/03/2015.

Normativa nº 17 (IN), somente em 2008 [32].

O PNSA, com prioridade para o enfrentamento da influenza e doença de Newcastle, é estruturado por uma rede de laboratórios oficiais e credenciados que promovem a vigilância nos principais polos de produção. A vigilância baseia-se na notificação obrigatória, diagnóstico laboratorial, assistência aos focos, medidas de biosseguridade, desinfecção e sacrifício sanitário, entre outras. Por se tratar de vírus que pode infectar todas as espécies aviárias, incluindo aves silvestres de vida livre ou cativeiro e de criações caseiras, a avaliação amostral deve incluir também estas aves, especialmente durante o combate ao foco. Em relação às aves de fundo de quintal, embora devam ser considerados os aspectos socioeconômicos envolvidos, o sacrifício sanitário não está acompanhado de uma política de indenização. Desta forma, o pequeno criador pode restringir o acesso de sua propriedade aos grupos de pesquisa [28].

As estirpes velogênicas causam alta mortalidade, de até 100%, especialmente em aves susceptíveis (não imunes), por não terem sido vacinadas ou sem contato prévio com o NDV.

Para reforçar a importância de aves silvestres na epidemiologia da doença de Newcastle [35] analisaram o soro sangüíneo de 103 pardais (*Passer domesticus*) capturados em granjas de corte (24/103) e postura (79/103) localizadas no estado de Pernambuco, através do teste de inibição da hemaglutinação e, detectaram títulos de anticorpos que variaram entre 2 e 64 em 10,68% das aves, com sorologia positiva e isolamento viral obtidos de pardais provenientes de granjas de postura.

Sinais clínicos e lesões

A DN por estirpes mesogênicas ou velogênicas pode atingir diversos sistemas, principalmente os sistemas respiratório, gastrointestinal e nervoso central e, varia em severidade, com a estirpe de vírus, o perfil imune e quanto à espécie de ave. As estirpes velogênicas causam alta mortalidade, de até 100%, especialmente em aves susceptíveis (não imunes), por não terem sido vacinadas ou sem contato prévio com o NDV. Clinicamente, com estirpes mesogênicas, a DN caracteriza-se por sinais respiratórios, incluindo conjuntivite (de lacrimejamento até hemorragia), corrimento nasal, diarréia, hemorragias (úlceras) intestinais e sinais nervosos centrais (incoordenação motora, opistótono, torcicolo). Estirpes velogênicas causam quadros muito mais graves, com alta mortalidade súbita (superagudos), muitas vezes sem sinais. Os sinais clínicos e lesões não são patognomônicos e podem ser confundidos com outra doenças, razão para que o diag-

nóstico definitivo dependa de exame laboratorial [1, 6, 7, 25, 39].

As lesões no sistema nervoso central podem resultar em falta de coordenação motora e torcicolo (Fig. 2). Entretanto, são várias as causas de incoordenação, de deficiências nutricionais, outras doenças infecciosas (encefalomielite aviária, colibacilose) e intoxicações. A infecção inicial é comumente na conjuntiva ocular, onde ocorre hemorragia (Fig. 3),

Fig. 2. Galinha com torcicolo. Estirpes velogênicas neurotrópicas podem causar sinal semelhante. Entretanto, neste caso, a causa foi lesão vestibular e facilmente diferenciável por não haver distribuição no plantel e mortalidade.

Fig. 3. Frango com conjuntivite. Infecção experimental com estirpe velogênica. Notar a abordagem de análise da conjuntiva ocular (Fonte: Cornell University, acesso em 08/03/2015).

assim como na traqueia (Fig. 4), moela e proventriculo (Fig. 5).

Diagnóstico

A DN é de notificação obrigatória por lei. Entretanto, para a notificação de surto assume-se responsabilidade legal, pelas consequências econômicas e sociais e, assim, sendo imputáveis, negligência e demora ou a informação irresponsável. A suspeita será fundamentada por Médico Veterinário habilitado, se atender ao quadro clínico-patológico

Fig. 4. Traqueia de ave experimentalmente infectada por estirpe velogênica. Notar a congestão difusa e focos de hemorragia traqueal. (Fonte: Cornell University, acesso em 08/03/2015)

Fig. 5. Proventriculo e moela de ave experimentalmente infectada com estirpe velogênica. Proventriculite com hemorragia multifocal na mucosa (Fonte: Cornell University, acesso em 08/03/2015).

descrito e em plantel não vacinado. Em termos gerais, reduz-se a probabilidade de DN em plantéis adequadamente vacinados e com títulos de anticorpos superiores a 32. Para a confirmação laboratorial, é necessário convocar o serviço oficial de vigilância no Estado (IMA), que fará a colheita de material e o envio ao laboratório de referência (LANAGRO, Campinas, SP).

Para a confirmação laboratorial, é necessário convocar o serviço oficial de vigilância no Estado (IMA), que fará a colheita de material e o envio ao laboratório de referência (LANAGRO, Campinas, SP).

No Brasil pode-se cogitar a possibilidade de surto de DN, por ocasião de doença de média ou alta mortalidade, especialmente em aves galináceas não vacinadas contra a DN. Toda a mortalidade acima de 1% no transporte e 10% na criação deve ter sua causa identificada [6, 7]. Diagnósticos diferenciais devem ser encaminhados nos casos de alta mortalidade, quando houver indicação/suspeita de envenenamentos, intoxicações, pasteurelose, salmonelose ou outras doenças que causam hemorragias, sinais respiratórios e nervosos. Considerando que os sinais clínicos e lesões não são patognomônicos e podem ser confundidos com outra doenças, o diagnóstico definitivo depende de exame laboratorial [1, 6, 7, 25, 39].

Não há razão, neste momento, para a suspeita de influenza aviária de alta patogenicidade, por estirpes asiáticas ou mesmo por estirpes locais no país. Entretanto, cresce a preocupação, com o diagnóstico de estirpes recombinantes H5N1, H5N2 e H5N8 em aves aquáticas na América do Norte (vide influenza aviária, Fig. 6). A vigilância de DN ocorre em paralelo com a vigilância de influenza aviária. Os estudos de monitoração de aves migratórias não têm encontrado estirpes de preocupação, mas apenas de baixa patogenicidade [Golono, 2009].

APMV-1 pode ser isolado em embriões de galinhas (SPF, livres de patógenos específicos), inoculados aos 8-11 dias de incubação via cavidade cório-alantóide (Fig. 6). A replicação viral resulta em atividade hemaglutinante (Fig. 7) no líquidio cório alantóide (LCA). O diagnóstico oficial da DN está regulamentado pelo MAPA no PNSA [Brasil 2009 a, b] e deve ser executado em laboratório credenciado. O isolado de APMV-1 é caracterizado, no laboratório de referência, para diferenciação entre vírus vacinal (lentogênico) e de doença (mesogênico ou velogênico), como segue:

1) Tempo médio de mortalidade embrionária (TMME). Diluições (base 10) entre -6 e -9, utiliza-se 100 microlitros (0,1 mL) inoculados via cavida-

de alantóide, na cavidade cório alantoide (CCA) ou LCA em embriões SPF (8-11 d) em mínimo de 5 ovos por diluição e observados por 7 dias. A mais alta diluição com 100% de mortalidade determina estirpe velogênica para mortalidade em menos de 60 horas; mesogênica para mortalidade entre 61 e 90 horas e lentogênica para mortalidade em mais de 90 horas ou ausência de mortalidade embrionária. Anticorpos específicos para APMV-1 podem ser determinados com o teste de inibição

Fig. 6. Inoculação embrionária via cavidade corioalantoide.

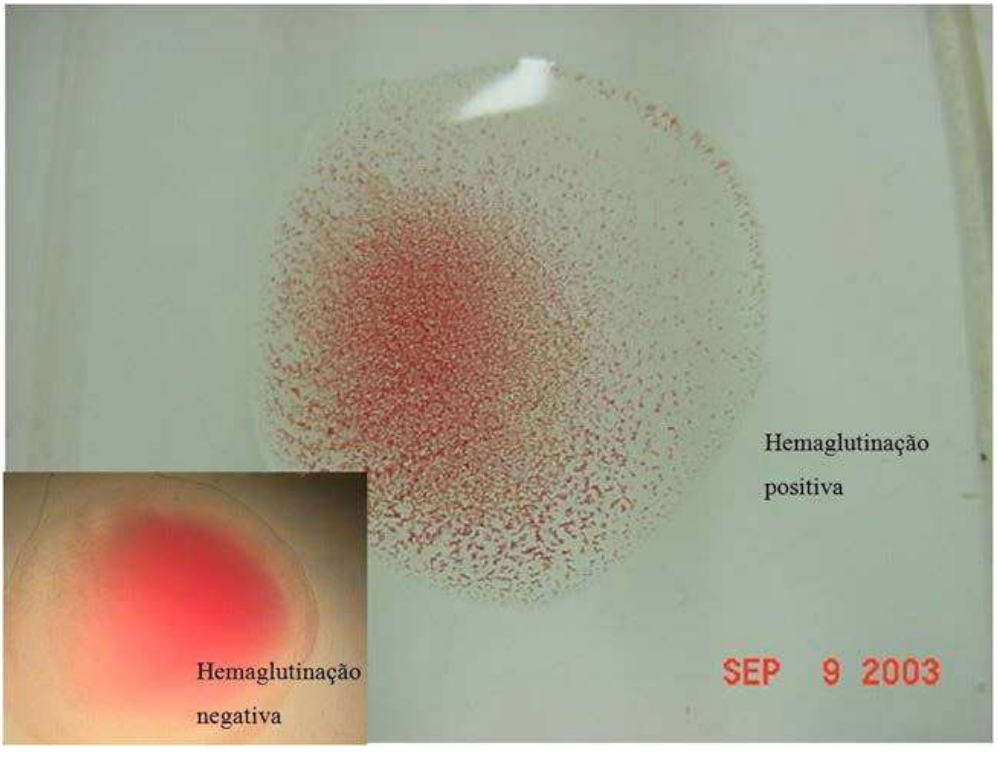


Fig. 7. Atividade hemaglutinante de líquido corioalantoide frente a hemácias de galinhas SPF a 5%.

da hemaglutinação (IH) (Fig. 8), com significância qualquer título acima de 8 em IH para aves não vacinadas. Para aves vacinadas, deve-se demonstrar o aumento de, no mínimo, dois logarítmos (em base 2) em média geométrica de títulos de anticorpos (resposta anamnéstica), comparando-se os títulos, no dia do atendimento e 15-21 dias após, por exemplo, a ascensão de 16 para 64.

2) Índice de patogenicidade intracerebral em pintos de 1 dia. Vírus de líquido cório-alantóide (LCA) com atividade hemaglutinante, diluido a 1:10 e livre de bactérias, 0,1 mL inoculado via intracerebral em pintos de 1 dia (SPF) e observados por oito dias (cada 24 horas). A interpretação e escores determina: 0 = normal; 1 = doente e 2 = morto, sendo o escore final a média de todos os oito dias. A interpretação determina serem velogênicas as estirpes com escore próximo de 2 e lentogênicas com escore próximo de 0.

3) Índice de patogenicidade intravenosa (IV) em frangas SPF de seis

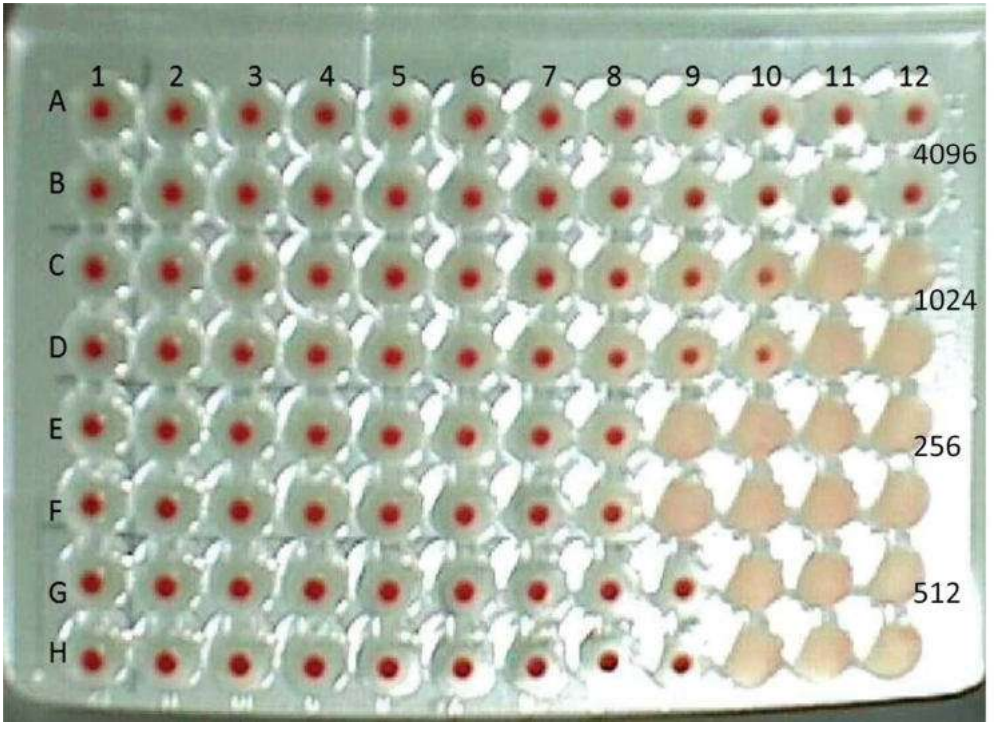


Fig. 8. Inibição da hemaglutinação em microplaca de 96 cavidades. Os testes de soros em duplicata foram realizados com APMV-1 com quatro unidades hemaglutinantes. Nas linhas A e B, soro com título ≥ 4096; linhas C e D, título 1024; linhas E e F, título 256; linhas G e H, título 512.

semanas, inoculadas com 0,1 mL de líquido cório alantoide hemaglutinante, diluido a 1:10 e livre de bactérias, inoculado IV em 10 aves (SPF) e 10 dias de observação diária: escore 0 = normal; 1 = doente; 2 = paralítico; 3 = morto. Interpretam-se como estirpes velogênicas com escore próximo de 3 e lentogênicas com escore próximo de 0.

Os escores de IPIC de vacinas vivas mais em uso no Brasil são Hitchner B1 (HB1) 0,2 e La Sota 0,4. As estirpes enterotrópicas assintomáticas têm escore de IPIC 0,0.

Os métodos de análise do genoma permitem a caracterização dos isolados, com transcrição reversa do RNA para DNA e amplificação (PCR). APMV-1 contém genoma RNA e necessita de transcrição reversa em cDNA para execução da PCR. A parte do genoma de APMV-1 que permite a caracterização da patogenicidade é a que codifica a região de clivagem da glicoproteína de fusão. O produto amplificado pode ser examinado com enzimas de restrição ou seqüenciamento. As estirpes patogênicas (mesogênicas e velogênicas, com IPIC > 0,7) têm na região codificadora do sítio de clivagem da hemaglutinina, código para múltiplos aminoácios básicos (Arginina e/ou Lisina nos resíduos 113-116 e Fenilalanina em 117) [Alexander, 2003; OIE, 2012; Wakamatsu et al., 2007].

A parte do genoma de APMV-1 que permite a caracterização da patogenicidade é a que codifica a região de clivagem da glicoproteína de fusão.

Apenas a demonstração de contato com APMV-1 por testes sorológicos ou isolamento viral, sem a definição da patogenicidade do vírus infectante, não é suficiente para imposição das medidas de controle, pois, cepas lentogênicas do vírus ocorrem em pássaros de todo o mundo e o uso de vacinas vivas é quase universal (Alexander, 2003). Desse modo, técnicas moleculares foram desenvolvidas em anos recentes com o intuito do diagnóstico definitivo rápido da patogenicidade [Alexander, 2003, Wakamatsu et al., 2007]. Entretanto, o diagnóstico pode ser dificultado pela presença de inibidores da PCR em muitos órgãos e tecidos, especialmente sangue e fezes (Gohm et al., 2000) e pela dificuldade de extração de RNA dos tecidos fixados pelo formol (Farragher et al., 2008).

Imuno-histoquímica (Kommers et al., 2001) e hibridização in situ (Brown et al., 1999) em tecidos fixados em formol foram valiosos para diagnóstico e determinar a distribuição viral (Brown et al., 1999; Wakamatsu et al., 2007). Há perspectivas de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) ter forte impacto na obtenção de imagem da célula viva e no diagnóstico médico (Levsky

e Singer, 2003). Estudos recentes utilizando a técnica FISH têm mostrado resultados rápidos e altamente sensíveis (McCarthy et al., 2008; Jergens et al., 2009). Entretanto, a detecção de mínimas quantidades do vírus não é possível com essas técnicas (Wakamatsu et al., 2007).

Prevenção e controle

Os núcleos ou granjas de produção e de reprodução (matrizes, avós ou bisavós), devem estar localizados em áreas livres de estirpes patogênicas de APMV-1. A zona livre da doença de Newcastle é o território geográfico definido legalmente com extensão de pelo menos de dez quilômetros em torno do estabelecimento.

O Manual de Legislação [Brasil 2009 a, b] determina que os estabelecimentos avícolas que realizam comércio internacional devem cumprir, além de outros procedimentos estabelecidos pelo MAPA, as exigências dos países importadores. No Art. 27, determina-se que a vacinação nos plantéis de aves de reprodução e comerciais somente poderá ser realizada com vacina devidamente registrada no MAPA. O programa de vacinação deverá ser específico por região e por segmento produtivo. As aves reprodutoras, à exceção de aves SPF, de postura comercial e aves ornamentais realizarão vacinação sistemática contra a DN. Os estabelecimentos de frangos de corte que realizarem vacinação para DN e outras doenças de controle oficial deverão obrigatoriamente informar a atividade ao serviço estadual de defesa sanitária animal.

No Brasil a DN pode ser prevenida por vacinação, com vacinas vivas preparadas com estirpes não patogênicas (lentogências) do NDV, por exemplo no 1º dia de vida (estirpes Hitchner B1 ou HB1) e revacinações periódicas (estirpe La Sota). Para aves de maior longevidade (poedeiras e reprodutores), o programa vacinal geralmente inclui revacinações com vacina viva durante o crescimento e a revacinação com vacina inativada via intramuscular antes da postura.

O risco de desafio dos plantéis pode ser reduzido com a implantação de plano de biosseguridade, com confinamento e distanciamento, para evitar o contato com aves potencialmente portadoras, principalmente da ordem Anseriformes. Entretanto, as infecções com estirpes lentogênicas, mesmo vacinais, podem ter impacto em plantéis infectados por *Mycoplasma gallisepti-*

O risco de desafio dos plantéis pode ser reduzido com a implantação de plano de biosseguridade, com confinamento e distanciamento, para evitar o contato com aves potencialmente portadoras, principalmente da ordem Anseriformes.

cum ou *Escherichia coli*, infecções que podem ser controladas com antibioticoterapia antes e depois da vacinação. Os estudos australianos confirmaram a emergência de estirpes patogênicas (meso e velogênicas) a partir de não patogênicas (lentogênicas), por mutação na região de clivagem da glicoproteína de fusão [Kirkland, 2000; Westbury, 2001].

Referências

1. ALEXANDER, D. J. Newcastle disease and other paramyxovirus infections. In: CALNEK, B. W. et al. *Diseases of poultry.* 10.ed. Ames: Iowa State University Press, p.64-87, 2003.
2. ALEXANDER, D. J., P. H. RUSSELL, G. PARSONS et al. Antigenic and biological characterisation of avian paramyxovirus type 1 isolates from pigeons—An international collaborative study. Avian Pathol 14:365—376, 1985.
3. ALICE, F. J. et al. Ocorrência da doença de Newcastle na Bahia. *Boletim do Instituto Biológico*, Salvador, v. 3, p. 124-31, 1956.
4. AWAN, M.A. et al. The epidemiology of Newcastle disease in rural poultry: a review**.** *Avian Pathology* Huntingdon, v. 23, p. 405-423, 1994.
5. BOLETIM INFORMATIVO nº 925, semana de 21 a 27 de agosto de 2006, FAEP - Federação da Agricultura do Estado do Paraná. *Ministério da Agricultura confirma foco de Newcastle no Amazonas.*2006.
6. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Plano de contingência para influenza aviária e doença de Newcastle. 2009. Disponível em: http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Animal_Health_in_the_World/docs/pdf/PLANO_DE_CONTINGENCIA_VERS_C3O_1.3_JULHO_2009.PDF
7. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Manual de Legislação. Programas Nacionais de Saúde Animal do Brasil. 2009. 441 pp. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Aniamal/Manual%20de%20Legisla%C3%A7%C3%A3o%20-%20Sa%C3%BAde%20Animal%20-%20low.pdf
8. BROWN, C.; KING, D.J.; SEAL, B.S. Pathogenesis of Newcastle Disease in Chickens Experimentally Infected with Viruses of Different Virulence.Veterinary Pathology. v. 36, p. 125-132, 1999.
9. CUNHA, R. G.; SILVA, R. A. Isolamento e identificação do vírus da Doença de Newcastle no Brasil. *Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária*, v. 23, p. 17-33, 1955.
10. FARRAGHER, S.M.; TANNEY, A.; KENNEDY, R.D.; HARKIN, D.P. RNA expression analysis from formalin fixed paraffin embedded tissues. Histochemistry Cell Biology. v. 130, p. 435-445, 2008.
11. FLORES, M.L.; SEGABINAZE, S.D.; SANTOS, H.F.; BASSAN, J.D.L. Epidemiologia da Doença de Newcastle – Revisão bibliográfica. A Hora Veterinária. n. 153, p. 57-61, 2006.
12. GOHM, D.S.; THUR, B.; HOFMANN, A. Detection of Newcastle disease virus in organs and faeces of experimentally infected chickens using RT-PCR.Avian Pathlogy. n. 29, p. 143-152, 2000.
13. GOLONO, M.A. Epidemiologia e caracterização molecular de virus da influenza em aves residentes e migratórias no Brasil [tese]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo; 2009. 102 p.
14. HASTENREITER, H. La maladie de Newcastle au Brésil.*Bulletim Official International Epizzoties*, v.85, p.813-817, 1976.
15. ICTVdB Management (2006). 01.048.1.05.001.13.012.002. Newcastle disease virus WA2116. In: ICTVdB - The Universal Virus Database, version 4. Büchen-Osmond, C. (Ed), Columbia University, New York, USA.
16. JERGENS, A. E.; PRESSEL. M.; CRANDELL, J. et al. Fluorescent in situ hybridization confirms clearance of visible Helicobacter spp. associated with gastritis in dogs and cats. Veterinary Internal Medical. v. 2, n.1, p.16-23. 2009.
17. JØRGENSEN, P. H., K. JENSEN HANDBERG, P. AHRENS et al. Similarity of avian paramyxovirus serotype 1 isolates of low virulence for chickens obtained from contaminated poultry vaccines and from poultry flocks. Vet Rec 146:665—668, 2000.
18. KALETA, E. F.; BALDAUF. C. Newcastle disease in free-living and pet birds. In: ALEXANDER, D. J. *Newcastle disease*. Boston: KLUWER Academic Publishers, p. 197-246, 1988.

19. KIRKLAND, P. D. Virulent Newcastle disease virus in Australia: in through the 'back door'. Austral Vet J 78:331-333, 2000.

20. KOMMERS, G.D.; KING, D.J.; SEAL, B.S.; BROWN, C.C. Virulence of pigeon-origin Newcastle disease virus isolates for domestic chickens. Avian Diseases, v. 45, p. 906-921, 2001.

21. LEVSKY, J.M.; SINGER, R.H. Fluorescence in situ hybridization: past, present and future. Journal of Cell Science. v. 116, p. 2833-2838, 2003.

22. MAPA (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO). *Programa Nacional de Sanidade Avícola*. Portaria nº 193 de 19 de setembro de 1994 - Secretaria de Defesa Agropecuária. Disponível na internet em http://www.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao. Acessadoem 22/02/2009.

23. McCARTHY, Ú.M.; URQUHART, K.L.; BRICKNELL, I.R.An improved in situ hybridization method for the detection of fish pathogens. Journal of fish Diseases. n. 31, p. 669-677, 2008.

24. OIE (Office International de Epizooties). Newcastle Disease. Terrestrial Manual capítulo 2.3.14. 2012. http://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/2.03.14_NEWCASTLE_DIS.pdf. Acessado em 05/03/2015.

25. OLIVEIRA JUNIOR, J. G. et al. Vírus da doença de Newcastle em aves não vacinadas no Estado do Rio de Janeiro. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 33, n. 2, p. 381- 383, 2003.

26. OLIVEIRA, R. L; GIRÃO, F.G.F. Prevalência da doença de Newcastle, Brasil, 1971-1979. In: VI CONGRESSO BRASILEIRO DE AVICULTURA, 1979, Belo Horizonte. *Anais do VI Congresso Brasileiro de Avicultura*, p.122-28, 2006.

27. OLIVEIRA, R. L. et al. Doenças de aves diagnosticadas em dois laboratórios de Belo Horizonte entre 1975-1980. In: 7o CONGRESSO BRASILEIRO DE AVICULTURA, 1981, Recife. *Anais do 7o Congresso Brasileiro de Avicultura*, p.248-59, 1981.

28. PAULILLO, A. C.; DORETTO JUNIOR, L. Doença de Newcastle. In: BERCHIERI JÚNIOR, A. & MACARI, M. (Eds.). *Doenças das aves.* Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, 2000, p.267-81. Jaboticabal: 2000.

29. PEARSON, J. E., D. A. SENNE, D. J. ALEXANDER et al. Characterization of Newcastle disease virus (avian paramyxovirus-1) isolated from pigeons. Avian Dis 31:105-111, 1987.

30. PEDERSEN, J.C.; SENNE, D.A.; WOOLCOCK, P.R. et al. Phylogenetic relationships among virulent Newcastle disease virus isolates from the 2002-2003 outbreak in North America. Journal of clinical Microbiology. v. 42, n. 5, p. 2329-2334, 2004.

31. PORTAL do Governo do Estado do Maranhão. Disponível em http://www.seagro.ma.gov.br/2008/4/17/Pagina660.htm. Capturado em 22/02/2009.

32. SANTOS, J. A. et al. A ocorrência da doença de Newcastle no Brasil (nota prévia). Revista de Produção Animal, v. 1, n. 1, p. 5-12, 1954.

33. SILVA, R.A. et al. Novos focos da doença de Newcastle no Brasil. Arquivos do Instituto Biológico Animal, v. 4, p. 109-114, 1961.

34. SILVA, J. S. A. et al. Newcastle disease vírus infection in sparrows (*Passer domesticus*, Linneaus, 1758) captured in poultry farms of the agreste region of the State of Pernambuco. Revista Brasileira de Ciências Avicolas, Campinas, v. 8, n. 2, p. 125-129, 2006.

35. SPALATIN, J. S. & R. P. HANSON. Recovery of a Newcastle disease virus strain indistinguishable from Texas GB. Avian Dis 10:372—374, 1966.

36. UTTERBACK, W. W. & J. H. SCHWARTZ. 1973. Epizootiology of velogenic viscerotropic Newcastle disease in southern California, 1971—1973. J Am Vet Med Assoc 163:1080—1090, 1973.

37. VAITSMAN, J.; MOUTSSATCÉ, I. Doença de Newcastle. Boletim 801 do Serviço de informação Agrícola, Ministério da Agricultura, 56p. 1954.

38. WAKAMATSU, N.; KING, D.J.; SEAL, B.S.; BROWN, C.C. Detection of Newcastle virus RNA by reverse transcription-polymerase chain reaction using formalin-fixed, paraffin-embedded tissue and comparison with immunohistochemistry and in situ hybridization. Journal Veterinary Diagnostic Investigation. v. 19, p. 396-400, 2007.

39. WESTBURY, H. Commentary. Newcastle disease virus: an evolving pathogen. Avian Pathol 30: 5-11, 2001.

3. Bronquite infecciosa das galinhas

bigstockphoto.com

Nelson Rodrigo da Silva Martins[1] - CRMV-MG 4809, nrsmart@gmail.com
José Sérgio de Resende[1] -CRMV-MG 1623
Josiane Tavares de Abreu[2] - CRMV-MG 5568
Maurício Resende[3]
[1] Professor associado, médico veterinário, mestre e doutor, DMVP, Escola de Veterinária, UFMG
[2] Professora, médica veterinária, mestra e doutora, Pontifícia Universidade Católica, MG
[3] Professor titular aposentado, médico veterinário, mestre e doutor, DMVP, Escola de Veterinária/UFMG

Introdução

A bronquite infecciosa das galinhas (BIG) é doença aguda altamente contagiosa de frangos e galinhas (*Gallus gallus domesticus*). A BIG é considerada atualmente uma das doenças que mais causa prejuízos à avicultura industrial de galinhas e frangos no Brasil e no mundo. Há grande impacto econômico, por causar aumento da mortalidade, perdas em desempenho produtivo, queda quantitativa e qualitativa na produção de ovos, infertilidade, facilitação de infecções oportunistas, que exigem o uso de antibióticos, e aumento na condenação de carcaças de frangos de corte no abatedouro [2,5]. É importante destacar que, em codornas domésticas (*Coturnix japonica* e *Coturnix coturnix*), a bronquite é causada por um adenovírus (*Aviadenovirus*), sem qualquer relação com a etiologia de BIG.

A BIG é considerada atualmente uma das doenças que mais causa prejuízos à avicultura industrial de galinhas e frangos no Brasil e no mundo.

Etiologia

A BIG é causada pelo vírus da bronquite infecciosa (IBV – *infectious bronchitis virus*), classificado no gênero *Gammacoronavirus*, família Coronaviridae, ordem Nidovirales, com genoma de RNA fita simples e polaridade positiva, e com envelope lipoproteico [2, 5, 9]. Os coronavírus descritos em faisão, galinha-d'angola, marreco e peru têm semelhança genética com IBV [3, 4, 11, 12]. Uma importante característica de IBV é a grande diversidade genética e antigênica. Uma população de IBV nunca é geneticamente idêntica, e a heterogeneidade (*quasispecies*) é a principal estratégia evolutiva de evasão à resposta imune e dificulta a eficiência vacinal. Outra estratégia evolutiva de IBV é a possibilidade de rearranjo genético entre diferentes IBVs [5, 9], podendo dar origem a progênies virais de risco para plantéis com proteção prévia heteróloga. O IBV foi o primeiro coronavírus descrito em animais (1937), nos Estados Unidos [5]. As estirpes de IBV podem ser classificadas em sorotipos heterogêneos com baixa proteção cruzada [2, 5], característica que torna difícil a implantação de programas eficientes e duradouros de vacinação.

A BIG é causada pelo vírus da bronquite infecciosa. As estirpes de IBV podem ser classificadas em diversos sorotipos heterogêneos com baixa proteção cruzada.

No envelope de dupla camada lipídica, as grandes projeções superficiais (S) são glicoproteínas essenciais para infecção, com papel na adsorção e penetração na célula. A região mais externa de S, denominada S1, liga-se aos receptores celulares glicoproteicos de tipo ácido siálico. Variações na composição de aminoácidos em regiões hipervariáveis de S1 determinam diversidade antigênica e de sorotipos [2, 5]. O RNA é copiado na célula infectada em seis segmentos de RNA subgenômicos (mensageiros), os quais, em coinfecção entre IBVs diferentes e na montagem de novos vírions, podem gerar recombinantes, com potencial de evasão à imunidade preestabelecida, representando o principal fator na emergência de novo surto de BIG em plantéis vacinados. No Brasil, em Minas Gerais, há estudos que demonstram a presença de IBVs com amplas variações genéticas [1] e sorológicas [7, 14, 15] na avicultura industrial, além de relatos também em outros estados, como SP [16], SC, PR e RS, sendo atualmente descrito um grupo brasileiro (BRI).

No Brasil, há estudos que demonstram a presença de estirpes de IBV com amplas variações genéticas e sorológicas na avicultura industrial.

Epidemiologia

A bronquite infecciosa das galinhas é causada por IBV e ocorre naturalmente em *Gallus gallus domesticus*. Em faisões e perus ocorrem coronavírus assemelhados e não IBV. Coronavírus do peru (TCoV) e coronavírus do faisão (PhCoV) são espécies distintas de IBV dentro de *Gammacoronavirus*, com apenas 34%, em média, de identidade no gene que codifica a glicoproteína S1. Estirpes de IBV mantêm entre si 75 a 85% de identidade em S1 [3, 11]. Entretanto, isolados de IBV semelhantes à estirpe vacinal H120 (>99% de identidade em S1) foram obtidos de pavão e marreco assintomáticos [12].

Um episódio de doença respiratória foi descrito em galinha-d'angola, com isolamento de coronavírus relacionado antigenicamente (neutralização cruzada) com IBV. Anticorpos de galinhas matrizes vacinadas contra IBV foram neutralizantes contra o isolado [10].

Uma diversidade de *Gammacoronavirus* foi detectada em espécies de aves domésticas e silvestres, das ordens Ciconiiformes, Pelecaniformes e Anseriformes [3].

Os estudos mais recentes indicam que a epidemiologia de coronavírus é complexa em classe *Aves*. Deve-se manter a mente aberta para a possibilidade de que a existência de múltiplos hospedeiros para infecção por IBV pode, eventualmente, resultar em doença em novas espécies [3].

Transmissão

A transmissão ocorre principalmente por aerossóis respiratórios, com vírus replicado no epitélio respiratório e eliminado em microgotas de muco respiratório durante a expiração [2, 5]. Nas regiões de concentração da avicultura (de *Gallus gallus domesticus*), há problemas continuados com BIG, pela proximidade e fácil difusão aérea de IBV em aerossóis respiratórios. Em granjas, ou regiões, com ocupação contínua de frangos de corte ou galinhas (sem vazio sanitário ou com falhas de biosseguridade), a imunidade induzida por vacinação pode eventualmente ser superada por variantes virais. Nessas condições, de proximidade e falha de biosseguridade, com presença contínua de aves, a transmissão é fácil, e a erradicação difícil. Como agravante, as estirpes que circulam na região podem ser derivadas de estirpes vacinais, por mutação, ou recombinação com IBVs de campo. Entretanto, é possível o controle de BIG em granjas ou núcleos sem vacinação contra BIG, que mantenham programa de biosseguridade, com manejo exclusivo, distanciamento, idade única e vazio sanitário entre lotes.

A doença pode atingir os sistemas respiratório, reprodutor, gastrointestinal e/ou excretor, em galinhas ou frangos, sendo recorrente tipicamente em granja ou região densamente povoada por múltiplas idades. O IBV infecta os epitélios respiratório, gastrointestinal, renal

e do oviduto, em intensidade e impacto variável conforme a estirpe [2, 5]. Há predominância de estirpes mais adaptadas à infecção respiratória, embora com reflexos nos demais sistemas citados, excretor (rins e ureteres) e reprodutivo (regiões do oviduto, magno e útero).

A BIG é tipicamente agravada por Escherichia coli, bactéria inalada em suspensão no ar, em galpões com baixa renovação de ar e alta concentração de poeira.

Patogenia

Para a infecção das células-alvo no epitélio ciliado respiratório, gastrointestinal, tubular renal, no magno e no útero, as glicoproteínas (S1) no envelope viral de IBV adsorvem aos receptores celulares que contêm ácido siálico, e essa atividade é dependente da integridade do envelope [2, 5]. A infecção respiratória é mais grave em aves mais jovens, com possibilidade de obstrução traqueal parcial (Fig. 1) ou total por muco, seguida de asfixia e morte. A infecção renal ocorre tipicamente após a infecção respiratória, exceto para estirpes de infecção renal exclusiva. Alguns IBVs produzem lesões graves nos rins (nefrite-nefrose), com morte por insuficiência renal. A infecção do oviduto nas fêmeas maduras e em produção resulta em, no magno, falha na síntese das proteínas do albúmen e, no útero, falha na produção da casca do ovo. A lesão no magno se caracteriza por produção de ovos com clara aquosa, e a lesão no útero por ovos de casca mole, frágil, mais fina e despigmentada, podendo também ocorrer ovos com deformidades na casca. A BIG apresenta gravidade variável com a estirpe de IBV envolvida, idade da ave, genética, sexo, qualidade do manejo, do ambiente, doenças concomitantes e *status* imune. Os problemas mais graves ocorrem em granjas que mantêm populações de galinhas/frangos de idades variadas e próximas. O desafio de pintinhos nas proximidades de aves mais velhas, especialmente para frangos de corte e poedeiras em recria, pode resultar em quadros mais graves. A BIG é tipicamente agravada por *Escherichia coli*, bactéria inalada em suspensão no ar, em galpões com baixa renovação de ar e alta concentração de poeira. Quadros respiratórios graves ocorrem, com maior frequência, em criações com baixa qualidade sanitária e de manejo, em galpões com baixa renovação do ar, tipicamente para aves que estão no chão, como frangos de corte e poedeiras em cria [2, 5].

Sinais clínicos

A doença predominante é respiratória (Fig. 1), com estertores, tosse, dispneia, insuficiência respiratória, asfixia e morte dos mais jovens. Os estertores respiratórios resultam da ciliostase e acumulação de muco no

lúmen traqueal (veja a atividade ciliar normal em https://www.youtube.com/watch?v=40Vxq5I22pM). Nas aves jovens, a forma respiratória pode evoluir para a forma renal, com a infecção que destrói a estrutura e a função renal, levando à mortalidade por insuficiência renal. Na traqueia, pode haver muco (Fig. 2), congestão e hemorragia, e nos rins acúmulo de uratos nos mesonefros e ureteres, com aumento de volume e marmorização (Fig. 4). Muitos IBVs podem infectar o oviduto de galinhas em crescimento ou em postura. As lesões no magno e no útero podem ser irreversíveis e resultar na formação de ovos com anomalias na clara e na casca, com cascas frágeis, trincadas, irregulares, moles ou ovos sem casca (Fig. 3). Alguns IBVs infectam os intestinos e resultam em diarreia, desidratação, deficiente digestão, absorção de nutrientes e nanismo infeccioso, sendo normalmente esses

Figura 1. Galinha com insuficiência respiratória e respiração com o bico aberto. Notar a presença de conjuntivite mucoide. Assista ao vídeo no YouTube: https://www.youtube.com/watch?v=_LF56iuT-og&spfreload=10

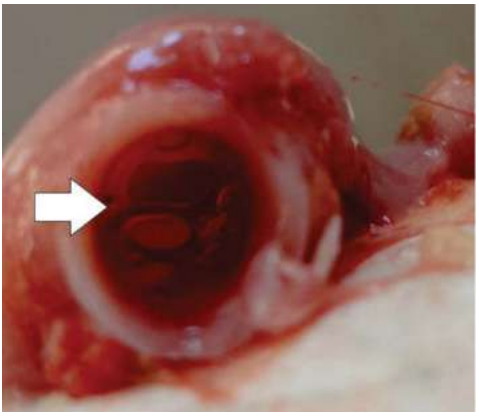


Figura 2. Imagem de traqueia de ave (Gallus gallus domesticus) jovem com muco espumoso em obstrução parcial do lúmen (seta).

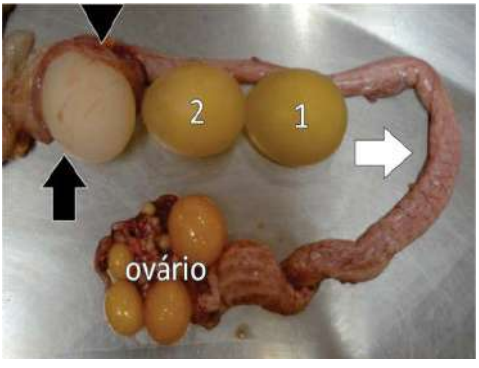


Figura 3. As regiões do oviduto atingidas, magno (seta branca) e útero (seta preta), resultam, respectivamente, em clara aquosa e ovos de casca frágil, mole ou sem casca. Notar, no útero aberto, um ovo em formação de casca (ponta de seta). Dois ovos sem casca, com uma (1) ou duas (2) membranas de casca, estão enfileirados sobre a região onde são produzidas essas membranas (istmo).

Figura 4. Processo de nefrite-nefrose renal (seta).

quadros associados a outros patógenos, como rotavírus, reovírus, calicivírus, parvovírus, entre outros, sugerindo ser um quadro multicausal [2, 4, 5].

Diagnóstico

A suspeita é especialmente significativa se há histórico de ocorrência prévia de BIG e não houve vazio sanitário ou não se empregaram estratégias adequadas de biosseguridade. Entre as viroses respiratórias, a BIG é a mais comum em regiões com alta densidade avícola, proximidade de granjas e multiplicidade de idades. Há doenças de manifestação clínico-patológica semelhantes à BIG, como as micoplasmoses (*Mycoplasma gallisepticum, M. synoviae*) e as colibaciloses (*Escherichia coli*), que podem ocorrer como coinfecções com IBV, pneumovirose (metapneumovírus aviário), laringotraqueíte infecciosa (*Iltovirus*) e doença de Newcastle (*Avulavirus*) por estirpes mesogênicas ou lentogênicas. O diagnóstico definitivo de BIG depende de confirmação laboratorial. Anticorpos específicos para IBV podem ser determinados por sorologia em ELISA [13] ou inibição da hemaglutinação (HI) [2,4,7]. Em aves vacinadas, podem-se observar títulos ascendentes em duas coletas de soros, com intervalo de 15 a 21 dias, e, em aves não vacinadas, os títulos de anticorpos mínimos significativos (acima de 8 em HI). Para o diagnóstico definitivo, o vírus deve ser isolado e caracterizado em laboratório [2, 5]. O isolamento pode ser feito por cinco passagens consecutivas em ovos embrionados de nove a 11 dias de incubação, obtidos de galinhas SPF, incubados por até sete dias após a inoculação. Cultivos de anéis de traqueia podem ser usados para o isolamento e estudo de IBV (https://www.youtube.com/watch?v=40Vxq5I22pM). Os tecidos de aves doentes ou anexos ou tecidos dos embriões podem ser examinados por métodos imunoenzimáticos ou por RT-PCR (transcrição reversa e reação em cadeia pela polimerase), para a detecção do IBV ou de seu genoma, respectivamente, geralmente após 48h de infecção em até cinco passagens. A RT-PCR, seguida de análise dos produtos por restrição enzimática ou sequenciamento, permite a caracterização do isolado. A RT-PCR e a análise do produto amplificado podem também ser feitas a partir dos tecidos das aves doentes.

Para o diagnóstico definitivo, o vírus deve ser isolado e caracterizado em laboratório.

Prevenção e controle

A infecção natural depende da integridade do envelope de IBV. Entretanto, o envelope viral pode ser destruído por limpeza com detergentes e desinfetantes, assim como fatores naturais de inativação, como o calor e a radiação

solar. Para a prevenção de BIG, pode-se necessitar do despovoamento (vazio sanitário) do núcleo, granja e/ou região, para a adequada desinfecção. A uniformização das idades das aves no núcleo, granja ou região, pode permitir a adoção de vacinação geral na granja, infecção vacinal homogênea, em data única, potencialmente a melhor estratégia para proporcionar uniformidade de respostas e menor escape de vírus mutantes. A resposta imune subprotetora é considerada indutora de pressão de seleção de vírus mutantes resistentes à imunidade prévia. A desuniformidade de *status* imune entre indivíduos em um plantel ou entre os plantéis pode resultar na emergência de IBV variantes, e perpetuam-se os episódios com vírus variantes. A adoção de data única de vacinação pode ser importante estratégia, com o objetivo de reduzir o escape de vírus para plantéis sensíveis e uniformização de resposta imune. As tentativas de controle por vacinação em granjas, núcleos ou regiões que mantenham idades múltiplas podem ter efeito benéfico por alguns ciclos de produção, com diminuição progressiva da eficiência devido à variação viral. No Brasil, para vacinas vivas, estão permitidas estirpes do sorotipo Massachusetts (H120, MA5, etc.), atenuadas por passagens consecutivas em ovos embrionados de galinhas SPF. As vacinas vivas podem ser aplicadas em pintinhos após a eclosão, ainda no incubatório, por nebulização, ou na chegada à granja, por nebulização ou gota ocular. A via água de bebida (vacinas vivas) tem resultado em resposta imune desuniforme. Para a proteção durante a produção de ovos, poedeiras e reprodutoras são geralmente revacinadas com vacina inativada aplicada via intramuscular no peito, que induz proteção sistêmica, especialmente importante para o oviduto. As vacinas inativadas, geralmente em emulsão oleosa para lenta absorção, são comumente combinadas para a proteção contra outras etiologias. As complicações bacterianas são comuns em BIG e aumentam a morbidade e a mortalidade para aves mantidas em piso, frangos de corte e frangas de reposição, mantidas em ambientes com baixa renovação de ar e com poeira em suspensão, que facilita a infecção respiratória por *Escherichia coli*. As infecções bacterianas secundárias comumente exigem terapia antibacteriana, escolhida com base em teste de sensibilidade.

Referências

1. Abreu, Josiane T.; Resende, J. S.; Flatschart, R. B.; Flatschart, Á. V. Folgueras; Martins, N. R. S.; Resende, M. Molecular Analysis Of Brazilian Infectious Bronchitis Field Isolates By Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, Restriction Fragment Length Polymorphism, And Partial Sequencing Of The N Gene. Avian Diseases V. 50, N.3, P. 494-501, 2006.
2. Avian Infectious Bronchitis, C H A P T E R 2 . 3 . 2 . OIE Terrestrial Manual 2013, Version adopted by the World Assembly of Delegates of the OIE in May 2013.
3. Cavanagh, D. Coronaviruses in poultry and other birds. Avian Pathology, 34, 439-448, 2005.
4. Chu, Daniel K.W.; Leung, C.Y.H.; Gilbert, M.;

Joyner, P.H.; Ng, E.M.; Tse, T.M.; Guan, Y.; Peiris, J.S.M.; Poon, L.L.M. 2011. Avian coronavirus in wild aquatic birds. J Virol 85:12815–12820.

5. Cavanagh,, David; Naqi,, A.S. (2003) Infectious Bronchitis. In: Saif YM, Barnes HJ, Glisson JR, Fadly AM, Dougald MC, Swayne DE (eds) Disease of Poultry, 11th ed. Iowa State University Press, Ames, pp 101–119.

6. de Wit, J. J. (Sjaak), Cook, J. K. A. & van der Heijden, H. M. J. F.. Infectious bronchitis virus variants: a review of the history, current situation and control measures, Avian Pathology, 40:3, 223-235, 2011.

7. Epiphanio, Ericka.O.B.; Martins, N.R.S.; Resende, J.S.; Pinto, R.G.; Jorge, M.A.; Souza, M.B.; Caccioppoli, J.; Cardozo, R.M. Resultados preliminares da utilização de cultivos de anéis de traqueia para o estudo de estirpes brasileiras do vírus da bronquite infecciosa das galinhas. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia , Belo Horizonte, v. 54, n.2, p. 212-216, 2002.

8. Hewson, Kylie A.; Noormohammadi, A. H.; Devlin, J. M.; Browning, G. F.; Schultz, B. K. & Ignjatovic, J. Evaluation of a novel strain of infectious bronchitis virus emerged as a result of spike gene recombination between two highly diverged parent strains. Avian Pathology 43, p. 249-257, 2014.

9. ICTV. International Committee on Taxonomy of Viruses. 2002. http://ictvdb.bio-mirror.cn/Ictv/fs_coron.htm

10. Ito, N.M.K., Miyaji, C.I. & Capellaro, C.E.M.P.D.M. (1991). Studies on broiler's IBV and IB-like virus from guinea fowl. In E.F. Kaleta & U. Heffels-Redmann (Eds.), II International Symposium on Infectious Bronchitis (pp. 302/307). Giessen: Justus Leibig University.

11. Lin, T.L., Loa, C.C. & Wu, C.C.. Complete sequences of 3' end coding region for structural protein genes of turkey coronavirus. Virus Research, 106 , 61 /70, 2004.

12. Liu, S., Chen, J., Chen, J., Kong, X., Shao, Y., Han, Z., Feng, L., Cai, X., Gu, S. & Liu, M. (2005). Isolation of avian infectious bronchitis coronavirus from domestic peafowl (Pavo cristatus) and teal (Anas). Journal of General Virology, 86 , 719 /725.

13. Martins, N. R. S.; Mockett, A. P. A. ; Barrett, A. D. T. ; Cook, Jane K. A.. IgM Responses in Chicken Serum to Live and Inactivated Infectious Bronchitis Virus Vaccines. Avian Diseases, v. 35, p. 470, 1991.

14. Mendonça, Juliana F. P.; Martins, N. R. S.; Carvalho, L. B. de; Sá, M. E. P. de; Melo, C. B. de. Bronquite infecciosa das galinhas: conhecimentos atuais, cepas e vacinas no Brasil. Ciência Rural (UFSM. Impresso), p. 1-0, 2009.

15. Souza, M.B.; Martins, N.R.S.; Resende, J.S. Afinidades Antigênicas De Amostras De Campo Do Vírus Da Bronquite Infecciosa Das Galinhas Com A Amostra Massachusetts M41. Arquivo Brasileiro De Medicina Veterinária E Zootecnia, V. 53, N. 2, P. 1-7, 2001.

16. Villarreal, L.Y., Sandri, T.L., Souza, S.P., Richtzenhain, L.J., de Wit, J.J., Brandao, P.E. Molecular epidemiology of avian infectious bronchitis in Brazil from 2007 to 2008 in breeders, broilers, and layers. Avian Diseases, 54, 894-898, 2010.

4. Doença de Marek

Nelson Rodrigo da Silva Martins[1]
- CRMV-MG 4809
Sandra Yuliet Marin[2]
Roselene Ecco[3] *- CRMV-MG 8324*
Ana Caroline Doyle Torres[4]
[1] *Professor associado, médico veterinário CRMV 4809, mestre e doutor, DMVP, Escola de Veterinária, UFMG*
[2] *Pós-doutoranda, médica veterinária, mestra e doutora, DMVP, Escola de Veterinária, UFMG*
[3] *Professora associada, médica veterinária, mestra e doutora, Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias, UFMG*
[4] *Mestranda, DMVP, Escola de Veterinária, UFMG.*

bigstockphoto.com

Descrita na Hungria em 1907 pelo médico veterinário Jozsef Marek, a doença de Marek (DM) adquiriu grande importância durante o século XX com o crescimento da avicultura. Após a descrição da etiologia viral em 1967-1968, foram desenvolvidas com sucesso as estratégias preventivas de DM baseadas em vacinação, que representaram em amplo controle da doença. Os estudos da DM em galinhas permitiram avanço no conhecimento das doenças tumorais em animais e têm servido de modelo para os estudos de alguns tipos de câncer em humanos [13]. A DM foi a primeira doença tumoral prevenida por vacinação na história da medicina. Outro aspecto médico importante é a alteração arterial (arterioesclerose), forma não neoplásica

A DM foi a primeira doença tumoral prevenida por vacinação na história da medicina. Outro aspecto médico importante é a alteração arterial (arterioesclerose), forma não neoplásica da doença, sendo hoje modelo médico para as arterioscleroses causadas por vírus.

da doença, sendo hoje modelo para as arterioescleroses causadas por vírus. A DM causou, por muitos anos, grande impacto em avicultura de galinhas, e seus efeitos negativos foram reduzidos de forma espetacular, como se "retirados com a mão", após o uso das vacinas em pintinhos no primeiro dia de idade e, mais recentemente, de forma alternativa, em embriões aos 18 dias de incubação. Atualmente são raros os episódios da DM e muitos estão relacionados a falhas vacinais, por falta de título vacinal ou doença imunodepressora que impeça a formação de resposta imune protetora, ou ainda, variação de vírus de campo [12]. A vacinação embrionária contra a DM representa antecipação vacinal, que tem como objetivo reduzir a probabilidade de infecção com estirpes de alta virulência emergentes. Além de galinhas, DM natural e experimental foi descrita em codornas japonesas e em perus, e a reprodução experimental em faisões [17].

A DM é causada por vírus denominado GaHV-2 - Marek's disease virus ou GaHV-2 - Gallid herpesvirus 2, da família Herpesviridae, subfamília Alphaherpesvirinae e gênero Mardivirus.

Etiologia

A DM é causada por vírus denominado GaHV-2 - *Marek's disease virus* ou GaHV-2 - *Gallid herpesvirus* 2, da família Herpesviridae, subfamília Alphaherpesvirinae e gênero *Mardivirus* [9, 14]. O GaHV-2 é classificado em três grupos distintos, denominados como sorotipo 1, 2 e 3. O sorotipo 1 contém todas as estirpes patogênicas, enquanto as estirpes do sorotipo 2 não são patogênicas. Integrantes do sorotipo 2 são representados pelos isolados de perus, não patogênicos e assemelhados antigenicamente a GaHV-2, e por isso, utilizáveis em vacinas (HVT, herpesvírus de peru) [3, 12, 17]. O GaHV-2, como todos os herpesvírus, contém genoma de DNA de fita dupla muito longa (125.000 pares de bases), 30 proteínas estruturais confirmadas e 10 propostas, com 11 presentes no envelope, sendo destas, pelo menos 10 glicosiladas [9, 14]. Ainda, como todos os herpesvírus, o GaHV-2 promove infecção persistente e vitalícia (latência), com ciclos de reativação modulados pela resposta imune [14]. As estirpes integrantes do sorotipo 1 (patogênico) diferem em patogenicidade [3, 16]. Nos anos 1980 houve o surgimento de variantes de alta virulência (vvMDV-*very virulent Marek's disease virus*), possivelmente por pressão seletiva exercida pela imunidade dos plantéis [3, 5, 12, 17]. Na pele descamada presente na poeira dos galpões, o GaHV-2 está protegido e muito estável, sendo a desinfecção ineficiente no am-

biente de galpão, apesar de GaHV-2 extracelular ser muito sensível aos detergentes e desinfetantes [2, 7, 12, 17].

Transmissão e patogenia

Galinhas portadoras transmitem via horizontal vírus para pintinhos sensíveis, por pele descamada eliminada pela ave portadora, que contém vírus infectante [2, 7]. As infecções por GaHV-2 têm alta disseminação nas regiões avícolas [12, 17]. As galinhas de criação industrial e de subsistência portadoras de GaHV-2, inclusive as aves vacinadas, eliminam e transmitem vírus de forma cíclica.

A DM é bastante comum na avicultura de subsistência em Minas Gerais (Martins et al., dados não publicados). Essas aves podem atuar de forma significativa como reservatório de vírus patogênicos. Apesar de haver vacinação obrigatória em 100% da avicultura comercial, pode ocorrer infecção (desafio) natural com vírus de campo [11] em aves vacinadas, embora nenhuma ave vacinada desenvolva tumores, por haver proteção antitumoral. Assim, aves (galinhas) vacinadas podem ser fonte de vírus patogênico, apesar de protegidas contra tumores [11], razão para serem mantidas estratégias de biosseguridade entre plantéis. O GaHV-2 é transmitido pelo contato indireto ou direto entre as aves.

A forma clássica de apresentação clínica é caracterizada por paralisias tipicamente unilaterais (Fig. 1), decorrentes da infiltração dos linfócitos T transformados nos nervos, além de processo inflamatório e de progressão crônica com letalidade moderada (até 30%).

O pintinho inala poeira do ambiente de criação, que contém pele descamada contendo vírus infectante [2, 7]. Nos capilares aéreos pulmonares, a poeira é fagocitada pelos macrófagos e ocorre a infecção destes. O vírus livre e/ou os macrófagos infectados entram em circulação e transferem infecção para os linfócitos B no baço e na bolsa cloacal (de Fabricius), que resulta em grave destruição de linfócitos B nesses órgãos e imunodepressão. Na fase inicial, a replicação e a lise de linfócitos se estendem para os linfócitos T do timo. Nessa fase da infecção, a atrofia do timo, do baço e da bursa pode ser identificada pela macroscopia e histologia desses órgãos (17). A viremia persiste e permite que, nos linfócitos T (do timo), ocorra a integração do genoma de GaHV-2 no genoma celular, resultando em transformação dos linfócitos T ativos em linfócitos T neoplásicos.

A forma clássica de apresentação clínica é caracterizada por paralisias tipicamente unilaterais (Fig. 1), decorrentes da infiltração dos linfócitos T transformados nos nervos, com intenso processo inflamatório e de progressão

crônica com letalidade moderada (até 30%) [12, 17, 18]. A forma aguda é de emergência mais rápida e mais grave, com impacto de morbidade e mortalidade altas, que resultam de infiltração tumoral disseminada para órgãos vitais [12, 17, 18]. A patogenia de GaHV-2 está principalmente determinada pela habilidade em transformar linfoblastos T em tumorais [12, 17]. Os linfócitos T transformados colonizam diversos tecidos (metástases). Na forma clássica, as alterações clínicas típicas ocorrem após as infiltrações linfoblásticas em nervos periféricos (causando perda e degeneração axonal), principalmente os de maior calibre, como os nervos ciático (Fig. 2), braquial, vago e intercostais. Os plexos dos nervos braquiais e ciáticos também são frequentemente acometidos [12, 17]. As paralisias de MD no membro posterior podem resultar na posição de perna estendida, tipicamente unilateral, por infiltrações tumorais no nervo ciático. Podem também estar paralisadas as asas, os músculos intercostais, a região lombar e os órgãos inervados pelo vago. A forma paralítica ou clássica resulta em processo crônico de emagrecimento e fraqueza, em parte resultantes da dificuldade de locomoção para alimentação.

A forma aguda da DM resulta em mortalidade mais grave e rápida e está associada ao desenvolvimento de tumores que impedem a função de órgãos vitais, como o fígado, os rins e o baço. Os tumores podem afetar a fertilidade (ovários, testículos) e atingir também o olho, na íris (causando fechamento da pupila) e músculos esqueléticos. A forma visceral pode ocorrer com alterações macroscópicas neurais pouco perceptíveis ou ausentes. Quando há envolvimento do sistema nervoso central (cérebro e cerebelo), linfócitos inflamatórios se infiltram ao redor dos vasos. Posteriormente, são substituídos por linfoblastos neoplásicos que invadem também o parenquima adjacente. A forma cutânea é caracterizada por infiltrações de linfoblastos nos folículos das penas. Quando a proliferação é intensa, pode invadir a epiderme e causar ulcerações [17], que, presentes na pele da região da cabeça (periocular), podem ser confundidas com bouba aviária, sendo importante a histopatologia para o diagnóstico diferencial.

Diagnóstico

A forma clássica de DM pode ser suspeita em aves, especialmente galinhas, com paralisia de pernas (mais comum unilateral) (Fig. 1), asas, pescoço e outros, especialmente em aves não vacinadas. As alterações nos nervos podem ser caracterizadas por aumento localizado ou simétrico no diâmetro do nervo, com hiperemia e/ou hemorragia (Fig. 2). Estes são quadros comuns em galinhas de fundo de quintal ou de subsistência. Em falhas vacinais ou depressão imune, em frangos de corte ou frangas pré-postura, as lesões de pele,

com folículos das penas aumentados e/ou hemorrágicos, podem ser sugestivas, especialmente se encontrados tumores em vísceras. A confirmação do diagnóstico depende de visualização microscópica das células tumorais e/ou detecção do antígeno [12, 17, 18] ou genoma viral nos tecidos [1, 3, 12, 17]. Os tecidos acometidos devem ser enviados para histopatologia, para a observação de infiltrados de células linfoblásticas pleomórficas (diagnóstico diferencial de leucose linfoide, com células linfoblásticas monomórficas). Na forma inflamatória, pequenos linfócitos e plasmócitos também estão presentes. Por imuno-histoquímica, linfócitos T podem ser demonstrados nos tumores com anticorpos mono ou policlonais específicos para linfoblastos T, ou GaHV-2 pode ser detectado nos tecidos infectados, usando anticorpos dirigidos para antígenos virais [12, 17, 18]. Na doença de Marek, os tumores são de origem linfoblástica T e diferentes de linfoblastos B presentes na leucose linfoide [18]. Reações em cadeia pela polimerase (PCR) estão descritas para a amplificação de segmentos de genes que codificam proteínas estruturais e não estruturais de GaHV-2 [1, 3, 8, 12, 17, 20, 22]. PCR com oligonucleotídeos específicos, por exemplo, dirigidos para a amplificação dos genes que codificam as glicoproteínas B, C, D, timidina quinase (TK) ou a proteína da célula infectada (ICP-4 – *infected cell protein* 4) [1, 3, 12, 17], permitem a confirmação da presença viral. O GaHV-2 pode ser

A confirmação do diagnóstico depende de visualização microscópica das células tumorais e/ou detecção do antigeno ou genoma viral nos tecidos.

Fig. 1. Ave de subsistência apresentando a forma clássica da doença de Marek, caracterizada por paralisia unilateral resultante da infiltração dos linfoblastos T transformados e por processo inflamatório nos nervos. Um vídeo da mesma imagem pode ser acessado em https://www.youtube.com/watch?v=BydP994Tp7E.

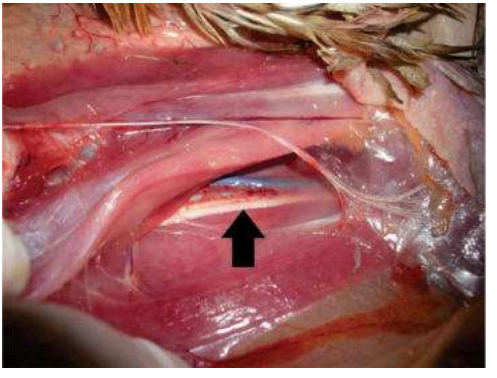


Fig. 2. Ave doença de Marek mostrada na Fig. 1. Nervo ciático com espessamento (seta) leve decorrente da infiltração de linfoblastos ativados e T transformados.

isolado dos tecidos infectados em ovos embrionados (membrana corioalantoide) [19] e em monocamadas primárias ou de linhagens contínuas [18]. Os isolados podem ser classificados quanto ao patotipo, uma vez que há diferenças em patogenicidade entre estirpes do sorotipo 1 [12, 17, 21].

Prevenção e controle

A vacinação contra a DM é obrigatória para todas as galinhas e frangos industriais no Brasil [4] e tem resultado em controle muito eficiente da ocorrência da doença. A vacinação *in ovo* é feita no 18º dia de incubação (ou seja, antes da eclosão), e a vacinação do primeiro dia de vida (ainda no incubatório) é feita via subcutânea. As vacinas contra a DM utilizadas no Brasil são sempre vivas, simples ou combinadas, e com um mínimo de 1.500 unidades formadoras de placas. Há vacinas preparadas com estirpes do GaHV-2 sorotipo 1 atenuadas (por exemplo, CVI988/Rispens), sorotipo 2 (por exemplo, SB1) naturalmente não patogênicas, ou vacina do sorotipo 3, herpesvírus de perus (HVT, *herpesvirus of turkeys*). As vacinas com HVT são as mais comumente utilizadas, preparadas com a estirpe FC126, relacionada antigenicamente ao GaHV-2, e podem ser conservadas liofilizadas (sublimação a -40°C) ou em nitrogênio líquido (vírus associado à célula). Todas as vacinas com estirpes de GaHV-2 são associadas à célula e mantidas em nitrogênio líquido [12, 17].

Referências

1. Barrow, A. and K. Venugopal. 1999. Molecular characteristics of very virulent European GaHV-2 isolates. Acta Virologica, vol. 43(2-3):90-93.
2. Beasley, J. N., L. T. Patterson, and D. H. McWade. 1970. Transmission of Marek's disease by poultry house dust and chicken dander. American Journal of Veterinary Research 31:339-344.
3. Becker, Y., Y. Asher, E. Tabor, I. Davidson, M. Malkinson, and Y. Weisman. 1992. Polymerase chain reaction for differentiation between pathogenic and non-pathogenic serotype 1 Marek's disease viruses (GaHV-2) and vaccine viruses of GaHV-2-serotypes 2 and 3. Journal of Virological Methods 40:307-322.
4. Brasil. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, GABINETE DO MINISTRO, INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 56, DE 4 DE DEZEMBRO DE 2007.
5. Buscaglia, C., Nervi, P., & Risso, M. 2004. Characterization of four very virulent Argentinian strains of Marek's disease virus and the influence of one of those isolates on synergism between Marek's disease vaccine viruses, Avian Pathology, 33:2, 190-195.
6. Calnek, B. W. and S. B. Hitchner. 1969. Localization of viral antigen in chickens infected with Marek's disease herpesvirus. Journal of the National Cancer Institute 43: 935-949.
7. Calnek, B. W., A. M. Alexander, and D. E. Kahn. 1970. Feather follicle epithelium: a source of enveloped and infectious cell-free herpesvirus from Marek's disease. Avian Dis. 14: 219-233.
8. Davidson, I., A. Borovskaya, S. Perl, and M. Malkinson. 1995. Use of the polymerase chain reaction for the diagnosis of natural infection of chickens and turkeys with Marek's disease virus and reticuloendotheliosis virus. Avian Pathol 24:69-94.
9. Index of Viruses - Herpesviridae (2006). In: ICTVdB - The Universal Virus Database, version 4. Büchen-Osmond, C (Ed), Columbia University, New York, USA. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/fs_index.htm

10. Kross, I., P. J. Davis, and R. W. Shilleto. Isolation of highly cytolytic GaHV-2 strains from Germany and Spain. Avian Pathology, vol. 27, no. 3, pp. 313-315, 1998.

11. Laneya, D.B., A.E. Jones, M. Zerbes, G.A. Tannock. 1995. Isolation of serotype 1 Marek's disease viruses from vaccinated Australian flocks. Veterinary Microbiology. Volume 46(1-3):213-219.

12. Marek's disease. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2014, Chapter 2.3.13. OIE, World Organisation for Animal Health http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/

13. Payne, L. N. 1985. Historical review. In L. N. Payne (ed.). Marek's disease. Martinus Nijhoff: Boston, 1-15.

14. Roizman, B.; Knipe, D.M.; WhitleyIn, R.J. Herpes Simplex Viruses. In: Fields Virology, Editors Knipe, David M.; Howley, Peter M. 5th Edition, Lippincott Williams & Wilkins, p. 2502-2601, 2007.

15. Schat, K.A. 2005. Isolation of Marek's disease virus: revisited. Avian Pathology, 34, 91-95.

16. Schat, K. A. and B. W. Calnek. 1978. Characterization of an apparently nononcogenic Marek's disease virus. Journal of the National Cancer Institute 60:1075-1082.

17. Schat, K.A., Nair, V (2008). Marek's disease. In: Diseases of Poultry, Twelfth Edition, Saif Y.M. et al., eds. Blackwell Publishing, Ames Iowa, USA, 452-514.

18. Sharma, J. M. 1998. Marek's disease. In D. E. Swayne, J. R. Glisson, M. W. Jackwood, J. E. Pearson, and W. M. Reed (eds.). A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens, 4th ed. American Association of Avian Pathologists: Kennett Square, PA, 116-124.

19. Sharma, J. M., Coulson, B, D, Young, E. Effect of In Vitro Adaptation of Marek's Disease Virus on Pock Induction on the Chorioallantoic Membrane of Embryonated Chicken Eggs. Infection and Immunity, Jan. 1976, p. 292-295.

20. Silva, R. F. 1992. Differentiation of pathogenic and non-pathogenic serotype 1 Marek's disease viruses (GaHV-2s) by the polymerase chain reaction amplification of the tandem direct repeats within the GaHV-2 genome. Avian Dis 36:521-528.

21. Witter, R.L., B. W. Calnek, C. Buscaglia, I. M. Gimeno & K. A. Schat (2005): Classification of Marek's disease viruses according to pathotype: philosophy and methodology, Avian Pathology, 34:2, 75-90.

22. Zhu, G. S., T. Ojima, T. Hironaka, T. Ihara, N. Mizukoshi, A. Kato, S. Ueda, and K. Hirai. 1992. Differentiation of oncogenic and nononcogenic strains of Marek's disease virus type 1 by using polymerase chain reaction DNA amplification. Avian Dis 36:637-645.

5. Anemia infecciosa das galinhas

Sandra Yuliet Marin[1]
Priscilla Rochele Barrios[2] *- CRMV-MG 7173*
Nelson Rodrigo da Silva Martins[3] *- CRMV 4809*
[1] *Pós-doutoranda, médica veterinária, mestra e doutora, DMVP, Escola de Veterinária, UFMG*
[2] *Professora associada, médica veterinária, mestra e doutora, Departamento de Veterinária, UFLA*
[3] *Professor associado, médico veterinário, mestre e doutor, DMVP, Escola de Veterinária, UFMG*

A anemia infecciosa das galinhas (AIG) é uma das mais importantes doenças do sistema imune de galinhas domésticas. Por muito tempo, as doenças anêmico-hemorrágicas foram pouco entendidas, com confusões nas descrições das patogenias da anemia infecciosa, da doença infecciosa bursal e das adenoviroses, possivelmente em razão de as infecções naturais serem comumente combinadas [11]. Outras doenças hemorrágicas e que afetam o sistema imune e a medula óssea, como as micotoxicoses, muitas vezes associadas às infecções virais, agravam o quadro patológico. Em 1979, no Japão, entretanto, com a descrição do vírus da anemia infecciosa das galinhas (CAV), inicia-se o esclarecimento da importante doença [14]. O CAV pode ter estado envolvido na maioria dos episódios de doença anêmico-hemorrágica de etiologia infecciosa descrita antes de sua descoberta. Aspectos importantes de CAV incluem sua alta resistência à desinfecção, a alta disseminação nas aves tanto da indústria avícola mundial quanto da brasileira [3, 4, 8, 11] e da avicultura familiar [1] e

o permanente risco de contaminação de vacinas [2, 8], que empregam cultivos primários ou embriões de galinhas. Por se tratar de doença que deprime ou mesmo suprime determinados aspectos da competência imune celular, a AIG significa importante impacto econômico para a avicultura industrial, por reduzir a produtividade e a resposta às vacinações e por resultar no aumento da susceptibilidade a agentes oportunistas [11]. Estudos experimentais observaram que a coinfecção em galinhas pelo CAV e outros patógenos tem efeito sinérgico sobre lesões macroscópicas, imunodepressão e mortalidade. Em coinfecção com o vírus da doença de Marek, a mortalidade pode ser muito elevada, e a coinfecção com *Orthoreovirus* da artrite viral (ARV) resulta em baixo ganho de peso e diminuição do hematócrito de forma mais acentuada. Galinhas previamente infectadas pelo vírus da doença infecciosa da bolsa (IBDV) apresentaram anemia e imunodepressão potencializadas quando inoculadas com o CAV [9]. Os estudos sobre a qualidade das vacinas comerciais revelaram a presença de tripla contaminação por CAV, ARV e *Aviadenovirus*, indicando que as vacinas vivas contra a encefalomielite aviária e a doença de Newcastle podem ter alterado significativamente a epidemiologia desses vírus.

Etiologia

A AIG é causada pelo vírus da anemia das galinhas (*chicken anemia virus* – CAV), a única espécie no gênero *Gyrovirus*, família Circoviridae, grupo caracterizado pelo genoma de DNA pequeno (em torno de 2.300 bases nucleotídicas), fita simples e circular, e capsídeo icosaédrico sem envelope de 23nm de diâmetro (Fig. 1) [6, 13]. O CAV é muito resistente à limpeza e desinfecção, resistindo aos principais produtos desinfetantes. Há outros integrantes de Circoviridae no gênero *Circovirus* descritos em outras espécies de aves, todos diferentes do CAV e entre si, como o circovírus da doença do bico e das penas

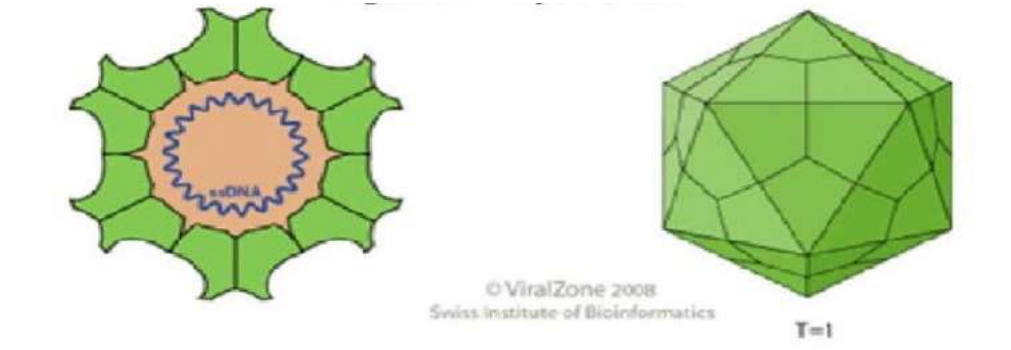


Figura 1. *Gyrovirus*

dos psitacídeos, circovírus de canários (e outras aves passeriformes da família Fringillidae), gansos, gaivotas, pombos, etc., e outros descritos em mamíferos, como humanos e suínos [6, 11].

Epidemiologia

A AIG tem transmissão vertical, da matriz para a progênie, e horizontal, da ave infectada para a ave sensível, por contato direto ou indireto. A infecção vertical é geralmente mais grave e fatal para os pintinhos, com o quadro típico hemorrágico, de anemia e depressão profunda do sistema imune. Quando pintinhos muito jovens e sensíveis são colocados nos primeiros dias de vida em contato com pintinhos infectados, ocorre transmissão horizontal, e estes podem desenvolver, em poucos dias, um quadro grave semelhante. A natureza altamente resistente do AIV torna muito difícil a limpeza e desinfecção de instalações, mesmo em vazio sanitário, resultando em permanente o risco de infecção para quaisquer plantéis, inclusive SPF [12].

A ocorrência de AIG foi descrita no início dos anos 1970 [6], e o CAV foi isolado pela primeira vez no Japão, em 1979 (estirpe Gifu-1) [13]. O primeiro relato de ocorrência no Brasil aconteceu em 1991 [3]. A demonstração da presença de CAV em galinhas da avicultura familiar [1] e a produção de vacinas nos anos 1990 foram documentadas no país [2], indicando fatores agravantes e complicadores da epidemiologia. Vacinas vivas contaminadas podem ter modificado a epidemiologia da AIG, com introdução de genótipos diferentes e agravamento da disseminação [8]. É interessante notar que a presença de CAV em vacinas contaminadas pode ter ocorrido antes da descrição de AIG no Brasil [2]. Estudos demonstram a alta disseminação de AIV tanto na indústria avícola mundial [9] quanto na brasileira [3, 4, 8, 11].

Sinais clínicos e lesões

A doença clínica em jovens ocorre por infecção de linfoblastos T no timo e de mieloblastos na medula óssea, tipicamente em aves jovens de até três semanas de idade, geradas por matrizes infectadas (infecção vertical), ou nos primeiros dias misturados com os pintinhos infectados. As principais características clínico-patológicas que devem ser procuradas são anemia profunda, hematócrito inferior a 27%, palidez (Fig. 2), hipoplasia da medula óssea (Fig. 3), atrofia e hemorragia no timo e hemorragias musculares [11].

Há infecção subclínica em casos de carga de desafio viral mais baixa, imunidade parcial ou estirpe de menor virulência. As aves sobreviventes ao quadro clínico ou subclínico são muito sensíveis às infecções oportunistas, têm baixo desempenho produtivo, e não respondem adequadamente às vacinações [11].

As atrofias do timo e da medula ós-

sea (examina-se o fêmur) são as lesões mais consistentes durante a faixa etária mais sensível, em aves de até três semanas de idade [10]. Nessa faixa etária, os poucos lóbulos residuais do timo apresentam-se hemorrágicos (vermelho-escuros), em contraste com o timo róseo saudável com 5-7 lóbulos de cada lado do pescoço na ave saudável.

As células atingidas são linfoblastos de origem tímica e mieloblastos da medula óssea (Fig. 4). As alterações histopatológicas caracterizam-se por anemia aplástica (*panmyelophthisis*) e atrofia linfoide generalizada. No timo, as perdas de linfócitos iniciam-se pelos linfócitos corticais, e não estão afetadas as células não linfoides (granulócitos e tecido conjuntivo). A grave depleção de linfócitos CD4+ e CD8+ ou o declínio seletivo de CD8+ têm papel importante no mecanismo de imunodepressão. Um quadro ainda mais grave de imunodepressão ocorre em infecção combinada com o vírus da doença de Gumboro e/ou micotoxicoses [11].

Com o avanço da infecção, a depleção linfoide atinge o córtex e a medula do timo, com degeneração hidrópica e necrose. Lesões na bolsa cloacal são menos expressivas e incluem também a rarefação/depleção linfoide e pequenos focos de necrose folicular, degeneração hidrópica do epitélio e proliferação de células reticulares [9]. Na medula óssea, a atrofia e a aplasia envolvem todas as linhagens hematopoiéticas, com pequenos focos de necrose. As perdas celulares hematopoiéticas são substituídas por células adiposas e

Figura 2. Pintinhos SPF com 28 dias inoculados com CAV no primeiro dia de vida.

Figura 3. Medula óssea hipoplásica de ave naturalmente infectada por CAV.

células do estroma (tecido conjuntivo). Infecções experimentais demonstraram início de regeneração medular aos 16-18 dias após a infecção (PI), com hiperplasia regenerativa da medula óssea em torno da quarta semana PI [11].

Diagnóstico

O quadro anêmico-hemorrágico, a extrema palidez de crista, barbela e musculatura e a mortalidade em pintinhos (de linhagens leves e pesadas) de até três semanas de idade podem sugerir anemia das galinhas. A determinação do hematócrito é informação auxiliar, o qual está reduzido para menos que 27% nas aves doentes. Em jovens, à necropsia, são observadas hemorragias, principalmente musculares, palidez em mucosas, hipoplasia ou aplasia da medula óssea (amarelada, pálida), atrofia do timo, e em histopatologia, rarefação linfocitária nos órgãos linfoides generalizada. Considerando-se os reprodutores do plantel doente, torna-se importante a investigação de eventual falha na biosseguridade, protocolo ou estratégia de imunoproteção e status sorológico para anticorpos anti-CAV.

CAV pode ser isolado em ovos de galinhas SPF ou em cultivos de células linfoblastoides T, a partir, principalmente, de linfócitos T do timo ou do baço. A transmissão vertical pode ser investigada no sangue, nos órgãos internos e nas membranas da casca de embriões [11]. Pode, também, ser isolado em pintinhos SPF de um dia de vida, os quais são inoculados por via intramuscular ou intraperitoneal, com a observação de lesões macroscópicas e o aparecimento de anemia em 12 dias após a inoculação (11). A amplificação de segmentos do DNA em PCR é atualmente a ferramenta de diagnóstico rápido. Os produtos amplificados são visualizados para estimar-se a massa molecular, e encaminha-se o sequenciamento do DNA para as comparações com as sequências descritas na literatura científica. As reações são principalmente

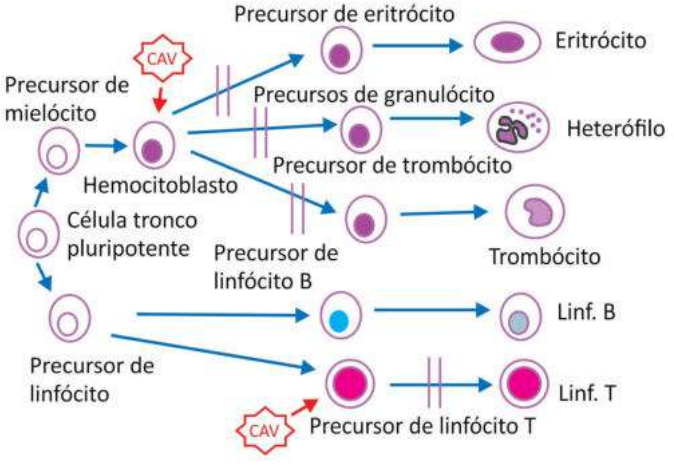


Figura 4. Células infectadas por CAV.

Adaptado de: https://microbewiki.kenyon.edu /index.php/ Chicken_Anemia_Virus_and_Depression.

desenhadas para a amplificação do gene que codifica a proteína VP1 estrutural. Pacotes de ELISA comerciais (*kits*, por exemplo, da Idexx, Synbiotics ou outro fabricante) podem ser empregados para o monitoramento de anticorpos anti-CAV em plantéis de reprodução [11].

Prevenção e controle

As estratégias de prevenção da anemia das galinhas objetivam evitar a doença do sistema imune, associada à perda precoce do timo e à atrofia da medula óssea em aves jovens, a forma mais grave de apresentação. Uma estratégia preventiva envolve evitar o desafio de reprodutores e de aves jovens com medidas de biosseguridade. Outra estratégia pode ser a vacinação durante a puberdade dos reprodutores, para assegurar imunidade durante a vida reprodutiva. Um dos principais objetivos da vacinação é a eliminação da transmissão vertical, evitando a infecção vertical dos jovens, modo de infecção mais grave para o sistema imune. Embora a proteção dos reprodutores transfira anticorpos de proteção passiva que atingem a circulação do pintinho (IgG), demonstrou-se transmissão vertical de vírus e anticorpos [5].

A adoção de política de biosseguridade na criação, sem misturas de procedências e de idades diferentes, é estratégia recomendada para todas as doenças infecciosas e pode ser um benefício para evitar diversos patógenos relevantes. Entretanto, o CAV é de difícil desinfecção, e eventuais falhas de biosseguridade podem determinar o desafio em regiões densamente povoadas.

Mantidos sob rigorosa biosseguridade, os reprodutores podem ser vacinados entre a 12ª e 15ª semanas de idade, para chegarem à maturidade (23ª semana) protegidos. Algumas estirpes vacinais destinadas aos reprodutores podem representar risco para aves jovens mantidas próximas.

Não há até o momento antiviral para circovírus de aplicação prática em avicultura. Para terapia de suporte, podem ser empregados princípios antibacterianos e antimicóticos, embora o dano ao sistema imune possa ser muito grave e inviabilizar economicamente o plantel.

Referências

1. Barrios, P.R. ; Marín, S.Y.G.; Resende, M. ; Rios, R.L. ; Resende, J.S. ; Horta, R.S. ; Costa, M.P. ; Martins, N.R.S. 2009. Occurrence of chicken anemia virus in backyard chickens of the metropolitan region of Belo Horizonte, Minas Gerais. Revista Brasileira de Ciência Avícola / Brazilian Journal of Poultry Science, v. 11, p. 135-138.

2. Barrios, Priscilla R.; Marin, Sandra Y.G.; Rios, Renata L.; Pereira, Claiton G.; Resende, Mauricio; Resende, José S.; Martins, Nelson R. S. 2012. A retrospective PCR investigation of avian Orthoreovirus, chicken infectious anemia and fowl Aviadenovirus genomes contamination in commercial poultry vaccines in Brazil. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 64, p. 231-235.

3. Brentano, L., N. Mores, I. Wentz, D. Chandratilleke, and K. A. Schat. 1991. Isolation and identification of chicken infectious anemia virus in Brazil. Avian Dis 35:793-800.

4. Canal, C. W.; Ferreira, D. J.; Macagnan, M. et al. 2004. Prevalence of antibodies against chicken anemia virus in broiler breeders in Southern Brazil. Pesqui. Vet. Bras., v. 24, n.2, p. 89-92.

5. Cardona, C. J., W. B. Oswald, and K. A. Schat. 2000. Distribution of chicken infectious anemia virus in the reproductive tissues of specific pathogen-free chickens. J Gen Virol 81:2067-2075.

6. ICTVdB Management (2006). 00.016.0.02.001. Chicken anemia virus. In: ICTVdB - The Universal Virus Database, version 4. Büchen-Osmond, C. (Ed), Columbia University, New York, USA. http://ictvdb.bio-mirror.cn/ICTVdB/00.016.0.02.001.htm.

7. Jakowski, R. M., T. N. Fredrickson, T. W. Chomiak, and R. E. Luginbuhl. 1970. Hemapoietic destruction in Marek's disease. Avian Dis 14, p. 374-385.

8. Marin, Sandra Y. G.; Barrios, Priscilla R.; Rios, Renata L. ; Resende, Maurício; Resende, José S.; Santos, Bernadete M.; Martins, N. R. S.. 2013. Molecular Characterization of Contaminating Infectious Anemia Virus of Chickens in Live Commercial Vaccines Produced in the 1990s. Avian Diseases, v. 57, p. 15-21.

9. Marin, Sandra Y. G. 2012. Anemia Infecciosa das Galinhas: Diagnóstico, Epidemiologia e Filogenia. Tese de doutorado. Universidade Federal de Minas Gerais.

10. Miller, M.M., Ealey, K.A., Oswald, W.B., Schat, K.A. (2003) Detection of chicken anemia virus DNA in embryonal tissues and eggshell membranes. Avian Dis 47, p. 662-671.

11. Schat, K. A.; Van Santen, V. 2008. Chicken Anemia Virus. In: Saif, Y.M., Fadly, A.M., Glisson, J.R., Mcdougald, L.R., Nolan, L. K. And Swayne D.E. (Eds.), Diseases of Poultry. 12th ed. Ames, Iowa State University, p. 211-235.

12. Schat, K.A., Schukken, Y.H. 2010. An 8-year longitudinal survey for the presence of antibodies to chicken infectious anemia virus in two specific-pathogen-free strains of chickens. Avian Dis. 54(1), p. 46-52.

13. Viral Zone. Gyrovirus. http://viralzone.expasy.org/all_by_protein/117.html.

14. Yuasa N., Taniguchi T., Yoshida I. 1979. Isolation and some characteristics of an agent inducing anemia in chicks. Avian Dis., 23 p. 366-385.

6. Doença infecciosa bursal

Nelson Rodrigo da Silva Martins[1] - CRMV-MG 4809
Maurício Resende[2]
Priscilla Rochele Barrios[3] - CRMV-MG 7173
Sandra Yuliet Marin[4]
[1]Professor associado, médico veterinário, mestre e doutor, DMVP, Escola de Veterinária, UFMG
[2]Professor aposentado, médico veterinário, mestre e doutor, DMVP, Escola de Veterinária, UFMG
[3] Professora Adjunta médica veterinária, mestre e doutora, Departamento de Veterinária, UFLA
[4] Pós-doutoranda, Escola de Veterinária, UFMG

A doença infecciosa bursal (DIB), também conhecida como doença de Gumboro, em referência à cidade dos Estados Unidos (no estado de Delaware) onde foi descrita pela primeira vez, é uma das principais doenças a comprometer a imunocompetência em aves. A doença atinge principalmente a bolsa cloacal (BC), outro nome para a bolsa de Fabricius, destruindo os linfoblastos B, precursores dos plasmócitos, estes responsáveis pela síntese de anticorpos. A doença é importante pela alta morbidade, alta a moderada mortalidade, imunodepressão por perda na diversidade de linhagens de linfócitos B e redução da viabilidade das aves industriais, com aumento da condenação por oportunismo infeccioso. A DIB está em muitos casos naturais, em infecção associada à anemia infecciosa das galinhas, causada por um circovírus que atinge linfócitos T (timo). As coinfecções, inclusive com outros vírus, como adenovírus e reovírus, e bactérias, como *Escherichia coli* e *Clostridium,* resultam em maior comprometimento das funções sistêmicas e do sistema imune, com maior morbidade, maior mortalidade e maior perda da imunocompetência [12, 25, 26].

A doença é importante pela alta morbidade, alta a moderada mortalidade, imunodepressão por perda na diversidade de linhagens de linfócitos B e redução da viabilidade das aves industriais, com aumento da condenação por oportunismo infeccioso.

Etiologia

A DIB é causada pelo vírus da doença infecciosa bursal (infectious bursal disease virus – IBDV), um birnavírus integrante da família Birnaviridae.

A DIB é causada pelo vírus da doença infecciosa bursal (*infectious bursal disease virus* – IBDV), um birnavirus (família Birnaviridae). Os birnavírus são caracterizados por genoma RNA de fita dupla em dois segmentos (razão para o nome, bi-RNA-vírus) e partículas (vírions) sem envelope. A cápsula proteica (capsídeo) tem a proteína VP2 como principal antígeno determinante da patogenicidade e imunogenicidade, na qual há variações determinadas por mutações na região codificadora no genoma [11]. Em *Gallus gallus domesticus* industriais (frangos de corte e galinhas) no Brasil, têm ocorrido surtos com estirpes de IBDV clássicas (tipo 52/70) desde 1978 e de alta virulência (vvIBDV) desde 1995. No mundo, os IBDV clássicos foram descritos a partir de 1962 (Gumboro, Estados Unidos), depois em várias partes do mundo, e os vvIBDV foram primeiramente descritos na Europa, no final dos anos 1980 [2, 6, 7, 16, 17, 18, 22, 43, 47].

As lesões concentram-se na bolsa cloacal, nos rins, nos intestinos e nos vasos sanguíneos dos músculos esqueléticos. Em plantéis jovens sensíveis, tipicamente, a DIB surge de forma rápida e atinge morbidade de 100%, causando apatia, diarreia e morte.

Transmissão e doença

A DIB é doença de transmissão horizontal da ave ou do ambiente infectado para a ave susceptível, direta ou indireta, principalmente via fecal-oral, mas também por inalação de poeira/aerossóis fecais. A infecção se dá em macrófagos e linfócitos B imaturos. A doença clínica ocorre em *G. g. domesticus* por vírus do sorotipo 1. As lesões concentram-se na bolsa cloacal (BC), nos rins, nos intestinos e nos vasos sanguíneos dos músculos esqueléticos [12, 25, 26]. Em plantéis jovens sensíveis, tipicamente, a DIB surge de forma rápida e atinge morbidade de 100%, causando apatia (Fig. 1), diarreia e morte.

Na BC, há progressivo aumento de volume até aproximadamente quatro dias de infecção, com edema (Fig. 2), hemorragia, transudato fibrinoso na serosa e muco na mucosa. A partir do quarto dia, há gradual redução do tamanho bursal, até a atrofia completa no sétimo dia após a infecção, coincidindo com o período de sinais clínicos e diarreia, profunda prostração (Fig. 1) e inatividade. Após a fase clínica

Fig. 1. Frango de corte. Ave com apatia, pescoço recolhido ("encorujada") e penas sujas, resultante de diarreia.

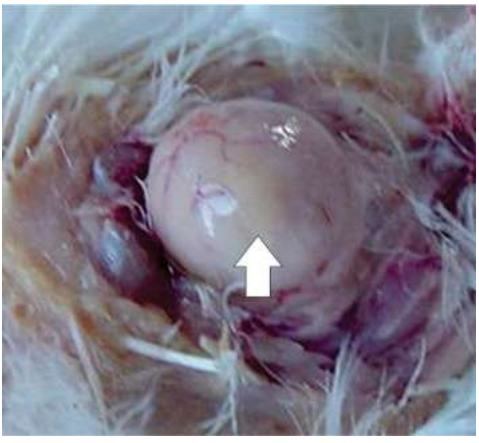


Fig. 2. Frango de corte. Bolsa de Fabricio aumentada de volume. Notar o aspecto amarelado das pregas visíveis através da serosa, resultante do edema (seta).

há recuperação clínica dos sobreviventes no plantel, embora grande parte dos indivíduos esteja com grave perda da competência imune humoral [12, 25, 26].

A infecção de aves jovens susceptíveis com estirpes clássicas resulta em alta morbidade (100%) e mortalidade moderada (média de até 30%), caracterizada por diarreia, desidratação, prostração (Fig. 1), inatividade, redução do consumo de alimento e aumento súbito da mortalidade. Em aves jovens, a doença surge de forma aguda ou superaguda, tipicamente com até sete dias de curso clínico. A manifestação de doença clínica está associada à existência do órgão-alvo – a bolsa cloacal – em seu tamanho máximo relativo à massa corporal da ave, com alta disponibilidade de células-alvo (linfoblastos B) disponíveis para a replicação viral, condição que ocorre em jovens entre três e seis a oito semanas de idade de frangos e galinhas. À necropsia, observam-se hemorragias nos músculos esqueléticos, principalmente coxas, pernas e peito, e a BC está aumentada (Fig. 2), podendo apresentar edema transudativo gelificado na face serosa até o terceiro ou quarto dias de infecção, ou atrofiado, do quarto ao sétimo dias de curso clínico. Na mucosa bursal, são observáveis petéquias, sufusões ou hemorragias luminais ou pontos claros, correspondentes à vacuolização folicular. Os rins podem estar aumentados, pálidos, por acumulação de uratos, ou hemorrágicos, e os ureteres podem conter uratos, por desidratação. As hemorragias são observadas, além da musculatura esquelética, também na mucosa do proventrículo, na mucosa de transição entre proventrículo e moela, no intestino delgado (placas de Peyer) e nas ton-

silas cecais. À histopatologia, a BC apresenta folículos linfoides com rarefação linfocitária, atrofia folicular, necrose e cistos foliculares (Fig. 3). Nas primeiras horas do início da infecção, há grande aumento da apoptose (morte celular programada) linfocitária bursal. A doença por estirpes vvIBDV (de alta virulência) pode ocorrer em todas as idades, tem o quadro clínico-patológico mais grave, com morbidade e mortalidade próximas de 100%.

A forma subclínica é a mais importante quanto ao impacto negativo para o sistema imune, conhecida como doença imunossupressora, e ocorre em aves jovens antes de haver colonização linfocitária de órgãos linfoides secundários, com graves efeitos negativos na competência imune.

A forma subclínica é a mais importante quanto ao impacto negativo para o sistema imune, conhecida como doença imunossupressora, e ocorre em aves jovens antes de haver colonização linfocitária de órgãos linfoides secundários, com graves efeitos negativos na competência imune. Tipicamente, quanto mais jovem a ave infectada, maior a destruição dos precursores linfocitários (maior supressão imune), os linfócitos ainda concentrados na BC, e menor apresentação clínica. O fator agravante dessa forma é a falta de indicadores clínicos, que resulta na formação de plantéis com alta susceptibilidade a agente(s) de infecção oportunista, e a falta ou baixa resposta imune às vacinações, condições apenas percebidas após grande investimento na criação do plantel. A redução ou falta de colonização linfocitária dos órgãos linfoides secundários se deve à lise dos precursores de linfócitos B ainda na bolsa cloacal, destruída no jovem antes das três primeiras semanas de vida [9, 20, 21].

Fig. 3. Frango de corte. Corte histológico de bolsa cloacal atrofiada por inoculação experimental da estirpe 52/70. Notar a redução das pregas, com grande aumento relativo do espaço do lúmen, necrose dos folículos linfóides (F), com formação de folículos císticos e vacuolizados (V).

Diagnóstico

Em aves jovens, a infecção por estirpes clássicas, tem como indicadores para suspeita, a idade entre três e seis semanas de vida, o surgimento agudo e de curta duração, de até sete dias, com grave prostração, diarreia, hemorragias musculares e aumento, hemorragia e/

ou atrofia da bolsa cloacal, variável com o tempo após a infecção. A avaliação histopatológica da BC revela rarefação linfocitária, hemorragias, cistos e necrose foliculares (Fig. 3). Entretanto, lesões semelhantes na BC podem ser observadas em outras doenças, como na doença de Marek, e algumas micotoxicoses. O diagnóstico diferencial pode exigir a imuno-histoquímica para a detecção de antígenos de IBDV nos linfoblastos B, podendo, entretanto, mesmo a imuno-histoquímica não ser conclusiva, tendo em vista a alta disseminação de vírus vacinais na avicultura industrial.

A RT-PCR pode ser uma ótima ferramenta de diagnóstico, por permitir a detecção e caracterização genética das estirpes de IBDV.

A RT-PCR pode ser uma ótima ferramenta de diagnóstico, por permitir a detecção e caracterização genética das estirpes de IBDV, com possível diferenciação entre estirpe(s) vacinal(is) e de campo.

O diagnóstico sorológico, com a detecção de anticorpos para IBDV por ELISA, pode ser ferramenta em plantéis não vacinados, mas de difícil interpretação em núcleos ou granjas com múltiplas idades e diferentes épocas de vacinação, o que permite o intercâmbio de infecções vacinais. É importante destacar que, nessas condições, surgem as oportunidades para a reversão de virulência das estirpes vacinais.

Prevenção e controle

As primeiras estirpes usadas para a imunização de matrizes e para a indução de anticorpos passivos apresentavam alta patogenicidade para jovens [16]. A prevenção da DIB, a partir dos anos 1970, propunha a vacinação das matrizes com vacina inativada oleosa [40, 45] para a proteção passiva das progênies, pela transferência de anticorpos da classe IgG (IgY) aos pintinhos pela gema. Entretanto, a partir do final dos anos 1980, surgiram estirpes variantes de alta virulência, com aumento do desafio ambiental (devido à alta resistência de IBDV à desinfecção), capazes de superar a imunidade passiva dos pintinhos, tornando-se necessária a vacinação das progênies, com vistas à indução de imunidade ativa [2, 6, 7, 16, 17, 18, 22, 43, 47]. A imunidade ativa é mediada por todos os efetores da resposta imune, sendo mais eficiente e, principalmente, adaptativa. Para a redução da virulência residual das estirpes vacinais adaptadas ao ovo embrionado, estirpes foram adaptadas ao cultivo de células [35]. Atualmente, para a prevenção contra as estirpes de alta virulência (vvIBDV), há a necessidade da vacinação precoce, no 18º dia de incubação ou no primeiro dia de vida. No entanto, desde 1995, no Brasil, o desafio de IBD ressurgiu com força, causando doença

em aves jovens vacinadas, possivelmente pela acumulação ambiental do vírus, que é de alta resistência, e/ou pela ocorrência de estirpes de vvIBDV. Hoje, as novas condições de risco exigem, além da vacinação precoce, a implantação de biosseguridade rigorosa nas granjas. Todavia, os riscos e o grande efeito imunopatogênico de algumas estirpes vacinais foram descritos em diversos países e no Brasil [1, 4, 5, 16, 30], com a reversão de virulência por mudança de apenas um aminoácido na posição 253 da proteína VP2 (17). No Brasil, foi relatado episódio de doença por estirpe vacinal [4]. O escape vacinal entre lotes, principalmente das estirpes vacinais de baixa atenuação, pode resultar em doença por infecção precoce em lotes sensíveis. Por essa razão, recomenda-se a uniformização do manejo com idade única por núcleo, para permitir a vacinação simultânea de todas as aves. Não há tratamento antiviral disponível, e a terapia antibacteriana ou antimicótica para as infecções oportunistas pode não obter sucesso pelo fato de a debilitação do sistema imune ser persistente.

Os riscos e o grande efeito imunopatogênico de algumas estirpes vacinais foram descritos em diversos países e no Brasil.

Referências

1. BOUDAOUD, A., ALLOUI, N. (2008). Evaluation of the safety of live attenuated vaccine viruses against infectious bursal disease (Gumboro disease) in conventional broiler chicks. Rev Sci Tech. Dec;27(3):793-802.
2. BROWN M.D., GREEN P. & SKINNER M.A. (1994). VP2 sequences of recent European 'very virulent' isolates of infectious bursal disease virus are closely related to each other but are distinct from those of classical strains. J. Gen. Virol., 75, 675-680.
3. DARTEIL R., BUBLOT M., LAPLACE E., BOUQUET J.F., AUDONNET J.C. & RIVIERE M. (1995). Herpes virus of turkey recombinant viruses expressing infectious bursal disease virus (IBDV) VP2 immunogen induces protection against an IBDV virulent challenge in chickens. Virology, 211, 4781-4790.
4. DIAS, C. C. A., de OLIVEIRA SOUZA, F., da SILVA, E. M. S. A., ELLER, M. R., BARRIOS, P. R., dos SANTOS, B. M., MORAES, M. P., de ALMEIDA, M. R. (2009). Sequencing and phylogenetic analysis of the infectious bursal disease virus isolates from outbreak in layer flocks in the state of Minas Gerais. Brazilian Journal of Microbiology, 40(1), 205–207. doi:10.1590/S1517-838220090001000036
5. EDWARDS, K.R., MUSKETT, J.C., THORNTON, D.H. (1982) Duration of immunosuppression caused by a vaccine strain of infectious bursal disease virus. Res Vet Sci. Jan;32(1):79-83.
6. ETERRADOSSI N., ARNAULD C., TOQUIN D. & RIVALLAN G. (1998). Critical amino acid changes in VP2 variable domain are associated with typical and atypical antigenicity in very virulent infectious bursal disease viruses. Arch. Virol., 143, 1627-1636.
7. ETERRADOSSI N., PICAULT J.P., DROUIN P., GUITTET M., L'HOSPITALIER R. & BENNEJEAN G. (1992). Pathogenicity and preliminary antigenic characterization of six infectious bursal disease virus strains isolated in France from acute outbreaks. J. Vet. Med. [B], 39, 683-691.
8. ETERRADOSSI N., RIVALLAN G., TOQUIN D. & GUITTET M. (1997). Limited antigenic variation among recent infectious bursal disease virus isolates from France. Arch. Virol., 142, 2079-2087.
9. FAHEY K.J., MCWATERS P., BROWN M.A., ERNY K., MURPHY V.J. & HEWISH D.R. (1991). Virus-neutralizing and passively protective monoclonal antibodies to infectious bursal disease virus of chickens. Avian Dis., 35, 365-373.
10. HADDAD E.E., WHITFILL C.E., AVAKIAN A.P., RICKS C.A., ANDREWS P.D., THOMA J.A. & WAKENELL P.S. (1997). Efficacy of a novel in-

fectious bursal disease virus immune complex vaccine in broiler chickens. Avian Dis., 41, 882-889.

11. ICTVdB Management (2006). 00.009.0.02.001. Infectious bursal disease virus. In: ICTVdB - The Universal Virus Database, version 4. Büchen-Osmond, C. (Ed), Columbia University, New York, USA.

12. Infectious bursal disease (Gumboro disease) Chapter 2.3.12. - OIE Terrestrial Manual 2008.

13. JACKWOOD D.H. & SAIF Y.M. (1987). Antigenic diversity of infectious bursal disease viruses. Avian Dis., 31, 766-770.

14. JACKWOOD D.J. & JACKWOOD R.J. (1997). Molecular identification of infectious bursal disease virus strains. Avian Dis., 41, 97-104.

15. JACKWOOD D.J. (1990). Development and characterization of nucleic acid probes to infectious bursal disease viruses. Vet. Microbiol., 24, 253-260.

16. JACKWOOD, D.J., SOMMER, S.E. (2002). Virulent vaccine strains of infectious bursal disease virus not distinguishable from wild-type viruses with marker the use of a molecular. Avian Dis. Oct-Dec;46(4):1030-2.

17. JACKWOOD, D. J., SREEDEVI, B., LEFEVER, L. J., SOMMER-WAGNER, S. E. (2008). Studies on naturally occurring infectious bursal disease viruses suggest that a single amino acid substitution at position 253 in VP2 increases pathogenicity. Virology, 377, pp. 110-116

18. KOUWENHOVEN B. & VAN DER BOS J. (1993). Control of very virulent infectious bursal disease (Gumboro disease) in the Netherlands with so called 'hot' vaccines. Proceedings of the 42nd Western Poultry Disease Conference, Sacramento, California, USA, 37-39.

19. KWANG M.J., LU Y.S., LEE L.H., LIN D.F., LIAO Y.K. LEE C. & LEE Y.L. (1987). Detection of infectious bursal disease viral antigen prepared from the -cloacal bursa by ELISA. J. Chin. Soc. Vet. Sci., 13, 265-269.

20. LASHER H.N. & SHANE S.M. (1994). Infectious bursal disease. World's Poult. Sci., 50, 133-166.

21. LE NOUEN C., RIVALLAN G., TOQUIN D. & ETERRADOSSI N. (2005). Significance of the genetic relationships deduced from partial nucleotide sequencing of infectious bursal disease virus genome segments A or B. Arch. Virol., 150, 313-325.

22. LE NOUEN C., RIVALLAN G., TOQUIN D., DARLU P., MORIN Y., BEVEN V., DE BOISSESON C., CAZABAN C., GARDIN Y. & ETERRADOSSI N. (2006). Very virulent infectious bursal disease virus: reduced pathogenicity in a rare natural segment B-reassorted isolate. J. Gen. Virol., 87, 209-216.

23. LIM B.L., CAO Y., YU T. & MO C.W. (1999). Adaptation of very virulent infectious bursal disease virus to chicken embryonic fibroblasts by site-directed mutagenesis of residues 279 and 284. J. Virol., 73, 2854-2862.

24. LIN Z., KATO A., OTAKI Y., NAKAMURA T., SASMAZ E. & UEDA S. (1993). Sequence comparisons of a highly virulent infectious bursal disease virus prevalent in Japan. Avian Dis., 37, 315-323.

25. LUKERT P.D. & SAIF Y.M. (1997). Infectious bursal disease. In: Diseases of Poultry, Tenth Edition, Calnek B.W., ed. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA, 721-738.

26. LUKERT, P.D. and SAIF, Y.M. (2003) Infectious Bursal Disease. In: Saif YM, Barnes HJ, Glisson JR, Fadly AM, Dougald MC, Swayne DE (eds) Disease of Poultry, 11th ed. Iowa State University Press, Ames, pp 161-179.

27. MARQUARDT W.W., JOHNSON R.B., ODENWALD W.F. & SCHLOTTHOKEN B.A. (1980). An indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for measuring antibodies in chickens infected with infectious bursal disease virus. Avian Dis., 24, 375-385.

28. MEULEMANS G., ANTOINE O. & HALEN P. (1977). Application de l'immunofluorescence au diagnostic de la Maladie de Gumboro. OIE Bull., 88, -225–229.

29. MUNDT E. (1999). Tissue culture infectivity of different strains of infectious bursal disease virus is determined by distinct amino acids in VP2. J. Gen. Virol., 80, 2067-2076.

30. MUSKETT J.C., HOPKINS I.G., EDWARDS K.R. & THORNTON D.H. (1979). Comparison of two infectious bursal disease vaccine strains: Efficacy and potential hazards in susceptible and maternally immune birds. Vet. Rec., 104, 332-334.

31. ROSENBERGER J.K. & CLOUD S.S (1986). Isolation and characterization of variant infectious bursal disease viruses. J. Am. Vet. Med. Assoc., 189, 357.

32. ROSENBERGER J.K., KLOPP S., ECKROADE

R.J. & KRAUSS W.C. (1975). The role of the infectious bursal agent and several adenoviruses in the hemorrhagic-aplastic anaemia syndrome and gangrenous dermatitis. Avian Dis., 19, 717–729.

33. ROSENBERGER, J. K., SAIF, Y. M.; JACKWOOD, D. J. (1998) Chapter 43. In: Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens, Fourth Edition. AAAP, AMERICAN ASSOCIATION OF AVIAN PATHOLOGISTS University of Pennsylvania, New Bolton Center, Kenneth Square, PA 19348-1692, USA.

34. SCHNITZLER D., BERNSTEIN F., MÜLLER H. & BECHT H. (1993). The genetic basis for the antigenicity of the VP2 protein of the infectious bursal disease virus. J. Gen. Virol., 74, 1563-1571.

35. SKEELES J.K., LUKERT P.D., FLETCHER O.J. & LEONARD J.D. (1979). Immunisation studies with a cell-culture adapted infectious bursal virus. Avian Dis., 23, 456-465.

36. SMILEY J.R., SOMMER S.E. & JACKWOOD D.J. (1999). Development of a ssRNA internal control reagent for an infectious bursal disease virus reverse transcription / polymerase chain reaction – restriction fragment length polymorphism diagnostic assay. J. Vet. Diagn. Invest., 11, 497-504.

37. SNYDER D.B., LANA D.P., SAVAGE P.K., YANCEY F.S., MENGEL S.A. & MARQUARDT W.W. (1988). Differentiation of infectious bursal disease viruses directly from infected tissues with neutralizing monoclonal antibodies: Evidence for a major antigenic shift in recent field isolates. Avian Dis., 32, 535-539.

38. SNYDER D.B., VAKHARIA V.N. & SAVAGE P.K. (1992). Naturally occurring-neutralizing monoclonal antibody escape variants define the epidemiology of infectious bursal disease viruses in the United States. Arch. Virol., 127, 89-101.

39. THORNTON D.H. & PATTISON M. (1975). Comparison of vaccines against infectious bursal disease. J. Comp. Pathol., 85, 597-610.

40. VAKHARIA V.N., HE J., AHAMED B. & SNYDER D.B. (1994). Molecular basis of antigenic variation in infectious bursal disease virus. Virus Res., 31, 265-273.

41. VAN DEN BERG T.P. & MEULEMANS G. (1991). Acute infectious bursal disease in poultry: protection afforded by maternally derived antibodies and interference with live vaccination. Avian Pathol., 20, 409-421.

42. VAN DEN BERG T.P. (2000). Acute infectious bursal disease in poultry: a review. Avian Pathol., 29, 175-194.

43. VAN DEN BERG T.P., GONZE M., MORALES D. & MEULEMANS G. (1996). Acute infectious bursal disease in poultry: immunological and molecular basis of antigenicity of a highly virulent strain. Avian Pathol., 25, 751-768.

44. WU C.C., LIN T.L., ZHANG H.G., DAVIS V.S. & BOYLE J.A. (1992). Molecular detection of infectious bursal disease virus by polymerase chain reaction. Avian Dis., 36, 221-226.

45. WU C.C., RUBINELLI P. & LIN T.L. (2007). Molecular detection and differentiation of infectious bursal disease virus. Avian Dis., 51, 515-526.

46. WYETH P.J. & CULLEN G.A. (1979). The use of an inactivated infectious bursal disease oil emulsion vaccine in commercial broiler parent chickens. Vet. Rec., 104, 188-193.

47. ZIERENBERG K., RAUE R., & MULLER H. (2001). Rapid identification of very virulent strains of infectious bursal disease virus by reverse transcription-polymerase chain reaction combined with restriction enzyme analysis. Avian Pathol., 30, 55-62.

7. Laringotraqueíte infecciosa das aves e diagnóstico diferencial de outras doenças respiratórias

bigstockphoto.com

Roselene Ecco[1] *- CRMV MG 8324*
Nelson Rodrigo da Silva Martins[2] *- CRMV-MG 4809*
[1] *Professora associada, médica veterinária, mestra e doutora, Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias, UFMG*
[2] *Professor associado, médico veterinário, mestre e doutor, DMVP, Escola de Veterinária, UFMG*

Etiologia

A laringotraqueíte infecciosa (LTI) é uma infecção viral e de distribuição cosmopolita que acomete especialmente o trato respiratório superior e a conjuntiva das aves comerciais[21,33]. O vírus da laringotraqueíte pertence ao gênero *Iltovirus*, família Herpesviridae e subfamília Herpesvirinae. O vírus é taxonomicamente identificado como *Gallid herpesvirus* 1 (GaHV-1)[14]. Na microscopia eletrônica, GaHV-1 é caracterizado por partículas virais icosaédricas e com envelope, medindo entre 195 e 250nm de diâmetro[21,27]. O genoma é constituído por fita dupla de DNA, com aproximadamente 155Kb, possuindo em

A laringotraqueíte infecciosa (LTI) é uma infecção viral e de distribuição cosmopolita que acomete especialmente o trato respiratório superior e a conjuntiva das aves comerciais.

torno de 48% de resíduos de guanina (G) e citosina (C)[17]. A galinha é o hospedeiro primário e natural do GaHV-1, mas a doença também foi relatada em faisões[21] e em perus[36].

Distribuição e ocorrência

O vírus da LTI tem sido identificado em vários países e a doença permanece como um grave problema na população avícola. Quando surtos ocorrem, é responsável por grandes perdas econômicas, causadas pela queda na produção de ovos, pelo aumento da mortalidade, pela perda de peso e pela predisposição a outras doenças respiratórias[25,33,35]. É descrita principalmente em áreas de produção intensiva com alta densidade populacional e em países como EUA, China, Austrália, bem como na Europa e no sul da Ásia. A LTI em galinhas é controlada pelo uso de vacinas com o vírus vivo[21]. Essas vacinas foram produzidas atenuando o GaHV-1 por passagens sequenciais em ovos embrionados (CEO - *chicken embryon origin*)[40] ou por múltiplas passagens em cultura de células (TCO – *tissue cell origin*)[20]. Entretanto, em 2001, foi identificada a forma de laringotraqueíte infecciosa leve (silenciosa) no estado da Georgia (EUA), cuja ocorrência aumentou progressivamente[42]. Essa forma da doença tem sido associada com o uso de vacinas vivas. A doença também foi diagnosticada na Argentina, na Colômbia, no Uruguai e no Brasil.

No Brasil, a doença foi descrita pela primeira vez por Hipolito et al.[23]. Posteriormente, o vírus foi identificado em lotes de galinhas com sinais respiratórios em estados do Sul[4] e no estado de São Paulo[28,46]. No estado de Minas Gerais, a doença foi identificada em galinhas poedeiras nas granjas das terras altas da Mantiqueira[37] e em galinhas de subsistência da mesma região[38]. Entre os anos de 2003 e 2010, foram notificados ao Ministério da Agricultura os seguintes focos de LTI no Brasil: Bastos (SP), Paranoá (DF), Toledo (PR), Westfalia (RS), Guatapará (SP), Pedralva e Terras Altas da Mantiqueira (MG). Nas granjas das Terras Altas da Mantiqueira, de Bastos e de Guatapará, a doença está sendo controlada com vacinação. Inicialmente, a vacina CEO foi introduzida nas granjas de Bastos, e a vacina TCO nas granjas de Guatapará. Em Bastos, quando a mortalidade cessou, a vacina CEO foi substituída pela TCO. Nas Terras Altas da Mantiqueira, as vacinas vetoradas utilizando como vetores o FPV (do inglês *fowl poxvirus*) e o HVT (do inglês *herpesvirus of turkey*) foram introduzidas para o controle. Posteriormente, as outras duas regiões substituíram a vacina TCO pelas vacinas vetoradas. Nas demais localidades as aves foram sacrificadas, e as granjas repovoadas com aves não infectadas pelo vírus da LTI (informação ver-

bal: Bruno R. Pessamilio – Coordenação de Sanidade Avícola – Mapa).

As estirpes vacinais, especialmente das vacinas CEO, mas também a TCO, persistem em matrizes de corte e postura, tornando-as fontes de infecção[14]. A avaliação molecular do genoma viral de isolados norte-americanos indicou que estes são semelhantes às estirpes vacinais[34]. Tanto isolados de campo quanto estirpes vacinais podem estabelecer infecção latente em galinhas[2]. Embora a vacinação com vacina viva atenuada resulte em proteção das aves contra a doença clínica em locais endêmicos, isso não impede uma nova infecção por uma estirpe virulenta do campo e a infecção latente indesejada, podendo haver uma reativação viral isolada, a recombinação com estirpes de campo ou infecção associada a outros patógenos[21,29]. Recentemente, têm sido desenvolvidas vacinas baseadas em engenharia genética, com a inserção de genes do vírus da LTI em vetores (poxvírus aviário ou herpes vírus dos perus) ou pela deleção de genes determinantes de virulência[21].

Recentemente, têm sido desenvolvidas vacinas baseadas em engenharia genética, com a inserção de genes do vírus da LTI em vetores (poxvírus aviário ou herpesvírus dos perus) ou pela deleção de genes determinantes de virulência.

Patogênese

A principal forma de infecção ocorre pelo contato das aves portadoras com aves susceptíveis. As vias naturais de entrada do vírus são a nasal e a ocular, mas a infecção também pode advir pela via oral. Após a entrada, segue a fase de replicação viral na conjuntiva ocular e no epitélio das conchas nasais e, em seguida, no epitélio dos seios nasais, na laringe, na traqueia, nos pulmões e nos sacos aéreos. O vírus pode permanecer latente no gânglio do nervo trigêmio ou persistir no trato respiratório como infecção inaparente[21]. O vírus é disseminado pelas aves doentes ou portadoras pelas secreções oronasais, podendo alcançar outras aves susceptíveis pelo ar ou, mecanicamente, via fômites, esterco, cama e trânsito de funcionários ou outros animais pela granja. O

O vírus pode permanecer latente no gânglio do nervo trigêmio ou persistir no trato respiratório como infecção inaparente21. O vírus é disseminado pelas aves doentes ou portadoras pelas secreções oronasais, podendo alcançar outras aves susceptíveis pelo ar, ou mecanicamente via fômites, esterco, cama e trânsito de funcionários ou outros animais pela granja.

período de incubação varia de seis a 12 dias após infecção natural, via rota ocular e respiratória, e de dois a quatro dias após inoculação experimental via intratraqueal[17]. As aves portadoras podem frequentemente eliminar o GaHV-1, e essa disseminação pode variar e aumentar de intensidade por estresses, como início e pico de postura, alta densidade populacional, variações na temperatura e umidade, altos níveis de amônia, mudança de alimentação, transporte, entre outros[21,33].

Sinais clínicos e patologia

Clinicamente, a LTI na forma grave é caracterizada por uma doença respiratória aguda com sinais que incluem secreção nasal sanguinolenta, espirros e dispneia acentuada. Sinais clínicos relacionados à forma branda enzoótica incluem diminuição da produção de ovos, conjuntivite, edema dos seios paranasais, traqueíte leve, descarga nasal persistente e conjuntivite[21,33,44].

As alterações macroscópicas são observadas principalmente na conjuntiva e nas mucosas da laringe e da traqueia. Dependendo da estirpe viral, as alterações podem ser leves ou severas, consistentes com laringotraqueíte hemorrágica e/ou diftérica. Nas formas severas, há inicialmente hiperemia intensa e grande quantidade de exsudato fibrinoso. Posteriormente, ocorre necrose, hemorragia e formação de uma membrana diftérica espessa. A inflamação fibrinosa pode se estender para os brônquios, pulmões e sacos aéreos[21,33,44]. Em vários casos, acúmulo de material caseoso com fibrina pode ser observado na laringe e na parte inicial da traqueia (Fig. 1), levando à morte por sufocamento. Quando as aves morrem dessa forma, é comum a ocorrência de cianose, que pode ser observada no momento da morte.

As alterações histológicas variam com o estágio da doença. Geralmente a mucosa respiratória normal (Acesse o YouTube: https://www.youtube.com/watch?v=40Vxq5I22pM, para visualizar a atividade ciliar normal) apresenta como principal componente o epitélio ciliado e as glândulas produtoras de muco, importantes no mecanismo de defesa inicial (aparelho mucociliar). Alterações precoces incluem infiltração inflamatória na mucosa por linfócitos, plasmócitos, além de hiperemia e edema (Fig. 2, 3, 4, 5). Nessa fase, necrose multifocal do epitélio superficial pode ser

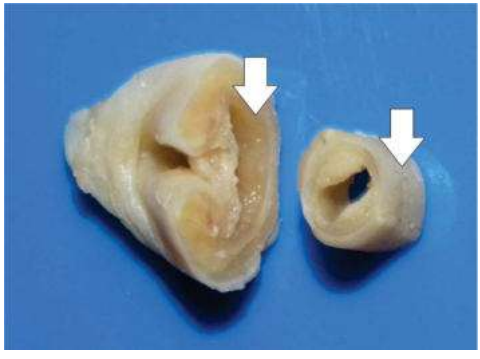


Fig. 1. Laringe e traqueia proximal de uma galinha com laringotraqueíte infecciosa. A mucosa está coberta por exsudato esbranquiçado (seta) ocluindo parcialmente o lúmen, caracterizando laringotraqueíte fibrinosa aguda.

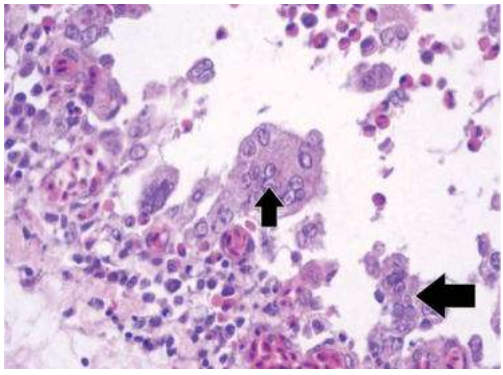


Fig. 2. Laringe e traqueia proximal de uma galinha com lesão típica de LTI. Na lâmina própria, há infiltrado por linfócitos e plasmócitos, necrose do epitélio com descamação e fusão do epitélio formando sincícios (seta grande), os quais apresentam corpúsculos de inclusões intranucleares (seta pequena). Hematoxilina e eosina 200x .

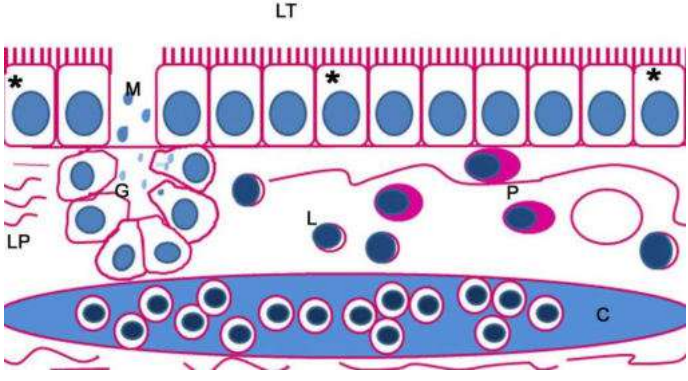


Fig. 3. Esquema da mucosa da traqueia histologicamente normal: cartilagem (C), lâmina própria (LP), glândulas (g) constituídas por células produtoras de muco (M), linfócitos (l), plasmócitos (p), epitélio ciliado (asterisco) e lúmen da traqueia (LT).

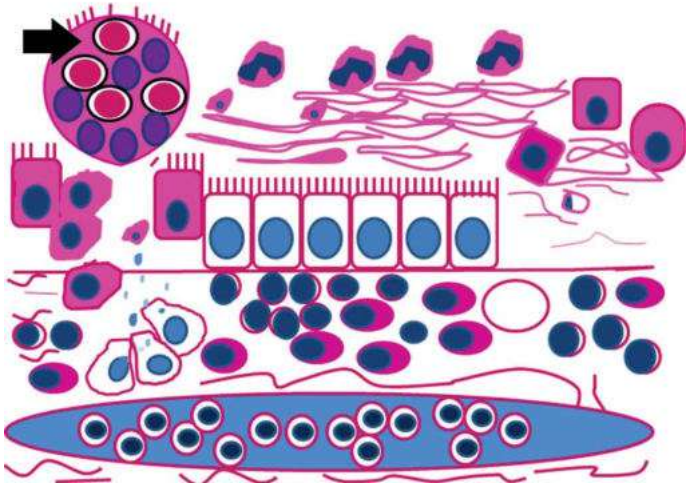


Fig. 4. Traqueia ilustrando lesões típicas da LTI. Necrose do epitélio ciliado e das glândulas com descamação para o lúmen e formação de sincícios (seta) contendo corpúsculos de inclusão intranuclear. No lúmen, observam-se também fibrina, células descamadas, restos celulares e heterófilos.

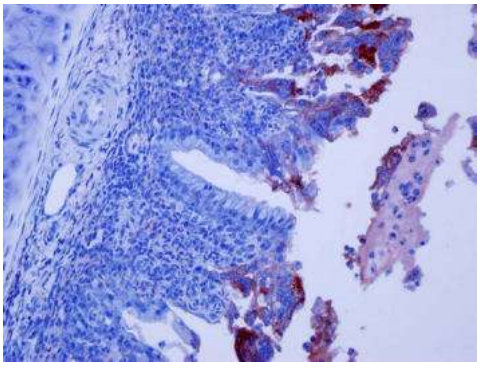


Fig. 5. Mucosa da concha nasal de uma galinha com laringotraqueíte infecciosa. A lâmina própria apresenta-se espessa devido ao infiltrado inflamatório. Na superfície e no lúmen, as células epiteliais sinciciais estão marcadas (grânulos marrons) para os antígenos de GaHV-1. Imunohistoquímica. 400x.

observada, e, após dois a três dias (em condições experimentais), sincícios em formação são observados. Posteriormente, numerosas inclusões intranucleares nas células epiteliais superficiais e principalmente nos sincícios podem ser observadas na mucosa da na laringe e na traqueia (Fig. 2, 4), nos pulmões, nos sacos aéreos, na conjuntiva e conchas nasais (Fig. 5). Com a progressão da infecção, a destruição celular e a descamação tornam-se difusas e formam uma membrana que recobre a superfície, e apenas uma fina camada de células epiteliais em regeneração é observada. Dependendo da virulência da estirpe, pode ocorrer perda completa do epitélio traqueal[21,44].

Diagnóstico e controle

O diagnóstico definitivo da doença causada pelo GaHV-1 é obtido pela histopatologia. Essa técnica define as lesões típicas (patognomônicas), como a traqueíte fibrino-necrótica (diftérica) com descamação epitelial e formação de sincícios contendo corpúsculos de inclusões intranucleares. A infecção pode ser confirmada pela detecção do antígeno pela reação em cadeia pela polimerase (PCR) ou pelo isolamento viral[15,33,44]. É importante ressaltar que somente a detecção do antígeno ou o isolamento não confirmam se a doença está ocorrendo, pois deve-se considerar a condição de latência desse vírus. De outra forma, a ausência de lesões histopatológicas não significa a ausência de infecção por estirpes da baixa patogenicidade.

O diagnóstico definitivo da doença causada pelo GaHV-1 é obtido pela histopatologia. Essa técnica define as lesões típicas (patognomônicas), como a traqueíte fibrino-necrótica (diftérica) com descamação epitelial e formação de sincícios contendo corpúsculos de inclusões intranucleares.

A imuno-histoquímica (IHQ) da conjuntiva e do epitélio respiratório permite a visualização (por meio de uma reação química enzimática que gera uma coloração marrom ou vermelha) de antígenos de GaHV-1 *in situ* (Fig.5), sendo útil principalmente nos casos

em que as inclusões intranucleares não são observadas na histopatologia[38,44].

A detecção do DNA viral pela PCR tem se mostrado uma ótima ferramenta para o diagnóstico da infecção pelo GaHV-1, com sensibilidade maior do que o isolamento viral, além de ser uma técnica relativamente rápida[15,25,33,37,38]. Atualmente, para a PCR, amostras teciduais fixadas em formol têm mostrado bons resultados para a detecção antigênica. Para permitir que o DNA extraído de amostras teciduais fixadas em formol e emblocados em parafina possa ser utilizado, as amostras devem permanecer no formol somente durante o tempo de fixação, até no máximo três a quatro dias. Após esse tempo, o formol danifica o DNA e este não pode ser extraído com qualidade suficiente para as reações. Caso não seja possivel enviar o material para o processamento dentro de três dias, recomenda-se lavar em água corrente e transferir o material para álcool 70% para sua melhor preservação. A PCR convencional para LTI tem mostrado resultados específicos e confiáveis[37].

As vacinas vivas atenuadas foram descritas como efetivas na proteção das aves contra LTI[22]. No entanto, Hughes et al.[24] demonstraram que o GaHV- 1 vacinal é capaz de ficar latente na ave vacinada, ser reativado e eliminado de forma intermitente para o ambiente. Um agravante importante é a reversão de virulência das estirpes vacinais em circulação, como descrito nos EUA[34]. Assim, foram desenvolvidas vacinas livres de GaHV-1, utilizando-se como vetores o poxvírus aviário e o herpesvírus dos perus para a expressão de proteínas relevantes à indução de proteção. Essas vacinas têm como característica a ausência de infecção por GaHV-1 e de reversão de patogenicidade. A proteção induzida por essas vacinas tem se mostrado menos efetiva que as vacinas vivas atenuadas[26], entretanto tem auxiliado na redução da atividade viral, na transmissibilidade e na redução de novos surtos da doença. Juntamente com a vacinação, é de extrema importância que se tomem medidas de biosseguridade para evitar a disseminação do vírus e para a prevenção de novos surtos.

O diagnóstico diferencial da LTI deve ser realizado incluindo outros agentes infecciosos que causam doença respiratória. Devem ser considerados: vírus da bronquite infecciosa, *Mycoplasma gallisepticum*, *Avibacterium paragallinarum*, metapneumovírus aviário e os vírus da doença de Newcastle e da influenza.

A seguir, os principais agentes infecciosos que devem ser considerados para o diagnóstico diferencial serão discutidos. Será dada ênfase à alteração histopatológica que auxilia no diagnóstico diferencial (ver as Figuras 1-10.) entre as infecções respiratórias e na coleta de amostras para os exames com o objetivo de diagnosticar a doença.

Bronquite infecciosa

A bronquite infecciosa é uma doença aguda das galinhas comerciais, que causa perdas significativas na avicultura industrial mundial. Em frangos, provoca perda de peso e aumento das condenações no abatedouro ou aumento da mortalidade quando a ave está sendo transportada para o abate. Em poedeiras, acarreta diminuição na produção e na qualidade dos ovos[32,45].

A doença é causada por um vírus do gênero *Coronavirus*, pertencente à família Coronaviridae (*Gammacoronavirus* aviário)[9,27]. A seguir, a abordagem referente ao diagnóstico diferencial em patogênese e as lesões terão como foco as estirpes com tropismo pelos tecidos respiratórios. A infecção inicial ocorre via trato respiratório superior. A replicação viral se dá no epitélio da mucosa das conchas nasais, na traqueia, nos pulmões e nos sacos aéreos.

Macroscopicamente, as lesões na mucosa respiratória da fase aguda são caracterizadas por hiperemia e exsudato mucocatarral a fibrino-hemorrágico (Fig. 6). Nas formas subaguda a crônica, exsudato caseoso pode ser observado, por infecção bacteriana secundária, principalmente com *Escherichia coli*. Áreas vermelho-escuras e consolidadas podem ser observadas ao redor dos brônquios, caracterizando pneumonia [9].

Na histopatologia da traqueia, a mucosa apresenta-se hiperêmica e edemaciada. Na fase aguda, há perda dos cílios, arredondamento e achatamento das células epiteliais, além de necrose multifocal e desprendimento. No lúmen, são encontrados eritrócitos, restos celulares e fibrina[9]. Nessa fase, ocorre o infiltrado por heterófilos e linfócitos na mucosa e no lúmen[9,13] (Fig. 7). Com a evolução da doença, após 48 horas, inicia-se a regeneração do epitélio. A hiperplasia é acompanhada por infiltrado linfocitário intenso, causando espessamento da lâmina própria. Os agregados de linfócitos se assemelham a folículos linfoides com centro-germinativo evidente. Essa alteração é observada aos sete dias de evolução da doença. Nessa fase, a lesão torna-se semelhante à causada pelo *Mycoplasma gallisepticum*, necessitando de testes complementares para o diagnóstico definitivo[9]. Assim, para o diagnóstico diferencial, é importante a seleção das aves durante a fase

Fig. 6. Traqueias de frangos com bronquite infecciosa apresentando exsudato mucocatarral no lúmen. California Animal Health & Food Safety Laboratory System (CAFHS) California, EUA.

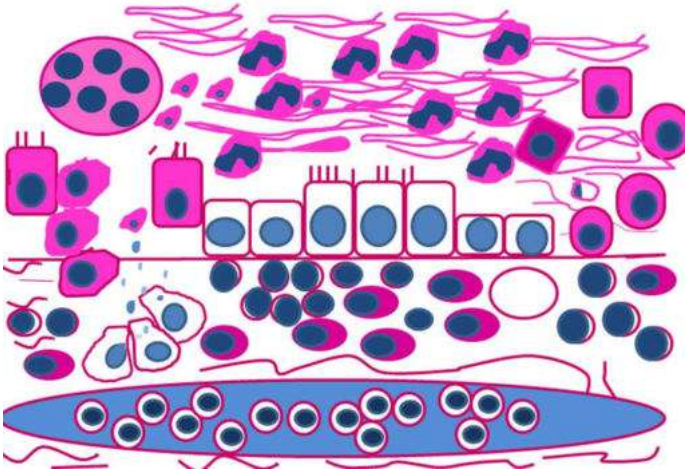


Fig.7. Traqueia ilustrando lesões típicas da fase aguda da bronquite infecciosa. A lâmina própria apresenta-se espessa devido ao infiltrado linfoplasmocitário; há necrose e descamação do epitélio. Há locais com substituição do epitélio ciliado por células cúbicas. No lúmen, observam-se restos celulares, células descamadas e fibrina.

aguda da doença para a coleta das amostras, com o exame de pelo menos seis aves[32].

Mycoplasma gallisepticum

Mycoplasma gallisepticum (*M. gallisepticum*) causa a denominada "doença crônica respiratória" (DCR) das galinhas e a sinusite infecciosa dos perus. *M. gallisepticum* é a espécie mais patogênica para aves e mundialmente distribuída, causando grandes perdas econômicas para a avicultura comercial[31]. Em comum com outros micoplasmas, são bactérias sem parede celular e muito pequenas, na forma de cocos com 0,25 a 0,5mm de diâmetro quando observadas ao microscópio de luz comum[30,31].

A infecção por *M. gallisepticum* ocorre principalmente em galinhas e perus em produção comercial. Entretanto, a bactéria também foi isolada de faisões, perdizes, pombos, pardais, cordornas, patos, gansos e papagaios. A transmissão horizontal pode ocorrer de forma direta, pelo contato com aves clinicamente ou subclinicamente infectadas, ou de forma indireta (fômites). *M. gallisepticum* sobrevive poucos dias fora do hospedeiro. Assim, aves carreadoras são essenciais para a epidemiologia e infecção. O trato respiratório superior e/ou a conjuntiva são portas de entrada para a bactéria presente em gotas de secreção das aves ou em aerossóis[3,31].

Os sinais clínicos da infecção por *M. gallisepticum* incluem estertores traqueais, secreção mucosa das narinas, da conjuntiva e espirros. Diminuição do consumo de alimento, perda de peso e, em galinhas de postura, diminuição da produção de ovos também ocorrem. Ceratoconjuntivite pode ocorrer, sendo caracterizada clinicamente por edema da face e das pálpebras, lacrimejamento e hiperemia[30].

Macrospicamente, as lesões consistem primariamente em exsudato mu-

cocatarral na cavidade nasal e nos seios nasais (Fig. 8), paranasais, na traqueia (Fig. 9), nos brônquios e nos sacos aéreos. Algumas estirpes de *M. gallisepticum* produzem aerossaculite e pericardite fibrinosa[19]. Estas, quando agravadas por outras infecções bacterianas, como *E. coli*, tornam-se caseosas. Quando a ceratoconjuntivite está presente, observa-se edema acentuado do tecido subcutâneo da face e das pálpebras, com ocasional opacidade da córnea[30,31].

Os casos crônicos de micoplasmose são caracterizados por formação de folículos linfoides subepiteliais na mucosa respiratória e também nos sacos aéreos. A alteração do epitélio ciliado e a formação dos agregados linfoides foliculares (denominada reação linfofolicular) são as alterações mais típicas da forma crônica da infecção por esse agente

À histopatologia, observa-se espessamento acentuado da membrana mucosa das conchas nasais, da traqueia, da conjuntiva, dos brônquios e dos sacos aéreos. Dependendo da estirpe, os sacos aéreos e/ou a conjuntiva podem não apresentar lesões. O espessamento ocorre devido ao intenso infiltrado por macrófagos, plasmócitos e linfócitos e à hipertrofia das células produtoras de muco. Na maioria das vezes e particularmente quando a infecção bacteriana secundária não está presente, o epitélio ciliado permanece. No entanto, em áreas multifocais observa-se perda dos cílios com alteração do formato das células ciliadas. Estas se tornam mais arredondadas ou planas e alguma vezes (em casos crônicos) ocorre metaplasia para epitélio pavimentoso estratificado. Os casos crônicos de micoplasmose são caracterizados por formação de folículos linfoides subepiteliais na mucosa respiratória e também nos sacos aéreos.

Fig. 8. Cavidade, seios e conchas nasais de uma galinha com infecção por M. gallisepticum. Há hiperemia da mucosa e exsudato mucocatarral.

Fig. 9. Traqueia de um frango com infecção por M. gallisepticum apresentando exsudato mucoso no lúmen.

A alteração do epitélio ciliado e a formação dos agregados linfoides foliculares (denominada reação linfofolicular) são as alterações mais típicas da forma crônica da infecção por esse agente[18,19] (Fig. 10). Quando essas lesões histológicas são observadas no curso crônico da doença, é de valia para o diagnóstico diferencial de outros agentes respiratórios, os quais não produzem lesões idênticas. Salienta-se a importância da avaliação histopatológica de todos os tecidos respiratórios, além do coração, dos rins e do oviduto. A avaliação detalhada pode permitir um diagnóstico histológico sugestivo ou compatível. Informações detalhadas referentes ao histórico do lote e da granja, incluindo vacinações, medicações, sinais clínicos, taxa de mortalidade, entre outros, são extremamente relevantes para auxiliar na interpretação das lesões e fornecer o diagnóstico da etiologia.

É importante ressaltar que resultados positivos pela PCR não devem ser considerados isoladamente para o diagnóstico conclusivo da ocorrência da doença por *M. gallisepticum*. A detecção pela PCR pode não diferenciar estirpes vacinais e aves portadoras[5]. No caso de lotes vacinados, devem-se associar resultados histopatológicos à detecção molecular ou ao isolamento. Para uma avaliação mais segura, é sempre importante a seleção de pelo menos cinco a seis aves doentes para necropsia e coleta das amostras teciduais.

É importante ressaltar que resultados positivos pela PCR não devem ser considerados isoladamente para o diagnóstico conclusivo da ocorrência da doença por M. gallisepticum. *A detecção pela PCR pode não diferenciar estirpes vacinais e aves portadoras.*

O sequencimento de nucleotídeos de determinados genes de *M. gallisepticum* é útil para a caracterização e dife-

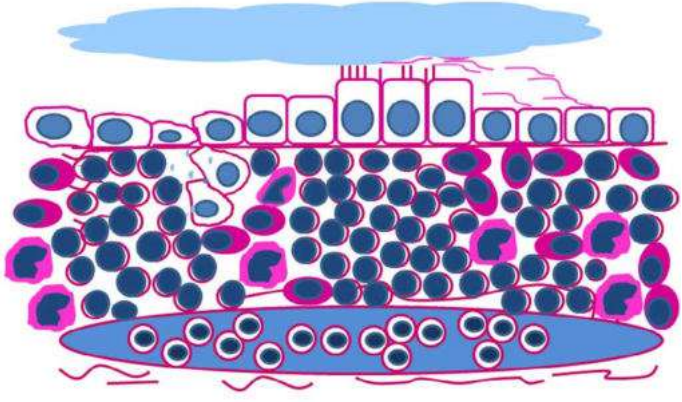


Fig. 10. Traqueia ilustrando lesões típicas de infecção por M. gallisepticum. A lâmina própria apresenta espessamento intenso, consequente do infiltrado por plasmócitos, macrófagos e linfócitos em arranjo linfofolicular. Ocorre também perda dos cilios, e o epitélio ciliado é substituído por células cúbicas ou planas com ausência de cílios.

renciação entre as estirpes vacinais e de campo[1], no entanto ainda é uma técnica com limitações para uso rotineiro nas atividades de diagnóstico.

A histopatologia é uma ferramenta diagnóstica essencial para o diagnóstico de causa e efeito. Entretanto, em algumas doenças, as lesões podem não ser suficientes para se obter um diagnóstico conclusivo isoladamente, sendo imprescindível, para definir se há doença, a associação dos resultados morfológicos com um ou mais testes auxiliares. A PCR, o isolamento ou a determinação de anticorpos em sorologia podem ser úteis. Associações entre técnicas de diagnóstico eficazes são essenciais em casos de doenças que podem ocorrer de forma mista ou quando infecções bacterianas secundárias são comuns.

Coriza infecciosa

A coriza infecciosa (CI) é uma doença respiratória aguda das galinhas, causada pela bactéria *Avibacterium paragallinarum,* anteriormente classificada como *Haemophilus paragallinarum*[7]. *Avibacterium paragallinarum*[7] é uma bactéria Gram-negativa que ocorre eventualmente em poedeiras da avicultura industrial e comumente em poedeiras da avicultura familiar. A doença tem significância econômica mundial na avicultura de corte (frangos) e, especialmente, de produção de ovos. A principal perda econômica é a redução na produção de ovos entre 10% a 40%[12], devido ao retardo do crescimento em aves jovens. No entanto, a doença pode causar um impacto muito maior, como ocorreu em surtos em poedeiras no estado da Califórnia (EUA), com mortalidade de 48% do lote e queda de 75% na produção de ovos[16], em frangos no estado do Alabama (EUA), que causou a condenação de 69,8% do lote devido à aerossaculite, além de surtos com perda econômica descritos na Europa e na África[8]. No Brasil, não há registros que quantificam mortalidade e perdas, mas a doença é aparentemente controlada em aves comerciais por vacinação.

As galinhas são hospedeiras naturais do *A. paragallinarum*. Galinhas de todas as idades são susceptíveis. O período de incubação é curto (24-48 horas) e o curso da doença é maior em poedeiras ou aves adultas (duas a três semanas). A doença é observada mais frequentemente no outono e no inverno[6,8].

Os sinais clínicos mais comuns incluem secreção nasal, edema facial, conjuntivite, anorexia e diarreia. A diminuição do consumo de alimento e água retarda o crescimento em aves jovens e reduz a produção de ovos em poedeiras[39]. A doença pode ter uma apresentação amplamente diversificada quando agravada por outros patógenos (*Mycoplasma gallisepticum*, *M. synoviae* e/ou agentes virais) e por fatores estressantes. As causas virais que podem estar associadas à CI incluem poxvírus aviário, laringotraqueíte e bronquite infecciosa[8].

As alterações macroscópicas associadas à CI aguda incluem inflamação catarral aguda das membranas mucosas dos seios e da cavidade nasal. Frequentemente ocorrem conjuntivite catarral e edema subcutâneo da face e da crista. Na forma crônica, os seios paranasais estão distendidos e preenchidos por exsudato caseoso (Fig. 11 e 12). O envolvimento de outros órgãos pode ser variável e inclui conjuntivite, aerossaculite e pericardite[16].

Fig. 11. Galinha poedeira com lesões típicas de coriza infecciosa. O seio paranasal e a pálpebra estão aumentados de volume e hiperêmicos. Note-se a acumulação de exsudato no saco conjuntival.

Fig. 12. Galinha poedeira com lesão crônica típica de coriza infecciosa, caracterizada pelo seio paranasal preenchido por exsudato caseoso.

As alterações histológicas agudas incluem edema, hiperemia, infiltração heterofílica e necrose epitelial da mucosa da cavidade nasal e dos seios paranasais (Fig. 13). Sinusite granulomatosa e heterofilica é observada na forma crônica. Em aves com envolvimento do trato respiratório inferior, foram observadas broncopneumonia catarral aguda e necrose do epitélio dos brônquios secundários e terciários. Nos sacos aéreos, a lesão é caracterizada por aerossaculite heterofílica e hiperplasia epitelial[8].

O tradicional método para o diagnóstico da CI requer isolamento da *A. paragallinarum* e extensa caracterização bioquímica para confirmar a identidade do isolado. A bactéria é fastidiosa e de crescimento lento, e frequentemente ocorre sobrecrescimento por outras bactérias comensais de rápido crescimento. A bactéria é NAD-dependente e a caracterização bioquímica requer

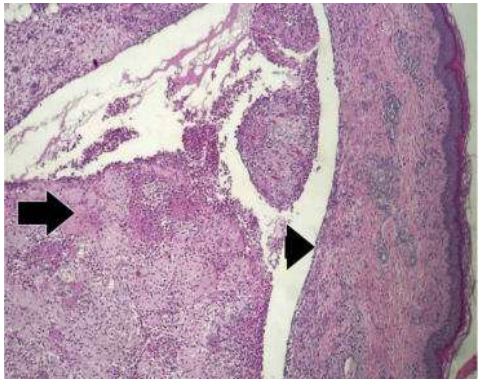


Fig. 13. Histopatologia do seio paranasal da galinha mostrada na Fig. 10. Há necrose e perda do epitélio (cabeça de seta) de revestimento da mucosa do seio paranasal. O lúmen está preenchido por exsudato (seta). Hematoxilina e eosina 100x.

meios de alto custo[6]. O isolamento é importante e deve ser considerado para a realização de antibiograma, principalmente para determinar antibióticos sensíveis e resistentes.

Métodos moleculares para o diagnóstico da CI, como a PCR, têm sido padronizados[10,11]. No entanto, a histopatologia deve ser utilizada na formação do diagnóstico, principalmente considerando-se que a galinha é o hospedeiro natural com possível infecção subclínica.

Recomendações para a coleta de amostras teciduais para histopatologia e testes auxiliares

As conjuntivas, as conchas nasais, os seios paranasais, a laringe com a traqueia, os brônquios, os pulmões e os sacos aéreos devem ser coletados. Para as doenças como a LTI, a bronquite e a micoplasmose, a parte central da traqueia pode ser retirada (fechada), com em torno de três a quatro centímetros, e mantida resfriada para o envio para os testes moleculares (idealmente em 24 horas). A laringe, a parte proximal e a parte distal da traqueia, os brônquios e os pulmões devem ser acondicionados em formol tamponado 10%, respeitando a proporção de nove partes da solução para uma parte do tecido coletado, o que garante uma boa fixação para a histopatologia. Para o exame histológico das conchas nasais e dos seios paranasais, a secção do tecido somente após a fixação permite que o conteúdo seja preservado no interior dos seios e, assim, possa ser avaliado. Em tais casos, essas partes podem ser fixadas juntamente com a cabeça da ave. Quando as aves apresentarem, além de sinais respiratórios, lesões renais (estirpe nefropatogênica do vírus da bronquite infecciosa) e ovos com defeito na casca e tamanho (estirpe reprodutiva do vírus da bronquite infecciosa), os rins, o ovário e o oviduto (útero) também devem ser coletados para histopatologia. Os cortes dos órgãos sólidos ou parenquimatosos não devem ser muito pequenos, mas também não devem ser seccionados a uma espessura maior que um centímetro, pois isso dificulta a difusão do formol, comprometendo a fixação. A seleção das aves para necropsia e coleta dos tecidos deve ser criteriosa. Quando for possível identificar aves em diferentes fases da doença (inicial ou aguda e avançada ou crônica), uma proporção de cada fase deve ser selecionada. Na fase aguda (primeiros dias), há lesões mais típicas para identificação de algumas dessas doenças. Os cuidados necessários para a coleta e a conservação das amostras aumentam consideravelmente as chances de se obter o diagnóstico. Por outro lado, amostras insuficientes e mal conservadas e sem um histórico detalhado prejudicam ou até mesmo impedem a obtenção de um diagnóstico preciso.

Referências

1. ARMOUR, N.K.; LAIBINIS, V.A.; COLLETT, S.R.; FERGUSON-NOEL, N. The development and application of a *Mycoplasma gallisepticum* sequence database. *Avian Pathology*, v. 42, p. 408-415, 2013.

2. BAGUST, T.J. Laryngotracheitis (gallid-1) herpesvirus infection in the chicken. 4. Latency establishment by wild and vaccine strains of ILT virus. *Avian Pathology*, v. 15, p. 581-595, 1986.

3. BAGUST, T.J.; JOHNSON, M.A. Avian Infectious Laryngotracheitis: virus-host interactions in relation to prospects for eradication. *Avian Pathology*, v. 24, p.373-391, 1995.

4. BELTRÃO, N.; FURIAN, T.Q.; LEÃO, J.A.; PEREIRA, R.A.; MORAES, L.; CANAL, C.W. Detecção do vírus da laringotraqueíte das galinhas no Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira.* v. 24, p. 85-88, 2004.

5. BENČINA, D.; DORRER, D. Demostration of *Mycoplasma gallisepticum* in tracheas of healthy carrier chickens by fluorescent-antibody procedure and the significance of certain serologic tests in estimating antibody response. *Avian Diseases*, v.28, p. 574-578, 1984.

6. BLACKALL, J.P. Infectious Coryza: Overview of the Disease and New Diagnostic Options. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 12, p. 627-632, 1999.

7. BLACKALL, P.J.; CHRISTENSEN, H.; BECKENHAM, T.; BLACKALL, L.L.; BISGAARD, M. Reclassification of *Pasteurella gallinarum*, [*Haemophilus*] *paragallinarum*, *Pasteurella avium* and *Pasteurella volantium* as *Avibacterium gallinarum* gen., comb. Nov. and *Avibacterium volantium* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 55, p. 353-362, 2005.

8. BLACKALL, P.J.; SORIANO, E.V. Infectious Coryza and Related Bacterial Infections. In: Saif, Y. M. Diseases of Poultry. 12th ed. Chapter 20, p. 789-803, 2008.

9. CANAVAGH D.; GELB Junior, J. In *Diseases of Poultry*. SAIF, Y.M.; FADLY, A.M. et al. Blackwell publishing, 12th ed, 2008.

10. CHEN, X.; MIFLIN, J.K.; ZHANG, P.; BLACKALL, P.J. Development and application of DNA probes and PCR tests for *Haemophilus paragallinarum*. *Avian Diseases*, v.40:398-407, 1996.

11. CHEN, X.; SONG, C.; GONG, Y.; BLACKALL, P.J. Further studies on the use of a polymerase chain reaction test for the diagnosis of infectious coryza. *Avian Pathology*, v. 27, p.618-624, 1998.

12. CHUKIATSIRI, K.; SASIPREEYAJAN, J.; NERAMITMANSUK, W.; CHANSIRIPORNCHAI, N. Efficacy of Autogenous killed vaccine of *Avibacterium paragallinarum*. *Avian Diseases*, v. 53, p. 382-386, 2009.

13. COOK, J.K.A.; JACKWOOD, M.; JONES, R.C. The long view: 40 years of infectious bronchitis research. *Avian Pathology*, v. 41, p. 239-250, 2012.

14. DAVISON, A.J.; EBERLE, R.; HAYWARD, G.S.; MCGEOCH, D.J.; MINSON, A.C.; PELLET, P.E.; ROIZMAN, B.; STUDDERT, M.J.; THIRY, E. Family Herpesviridae. In: Fauquet, C.M.; Mayo, M.A.; Maniloff, J.; Desselberger, U.; Ball, L.A. (eds), Virus Taxonomy, Academic press, San Diego, p. 193-212, 2005.

15. DIALLO, I.S.; TAYLOR, J.; GIBSON, J.; HOAD, J.; DE JONG, A.; HEWITSON, G.; CORNEY, B.G.; RODWELL, B.J. Diagnosis of a naturally occurring dual infection of layer chickens with fowlpox virus and gallid herpesvirus 1 (infectious laryngotracheitis virus). *Avian Pathology*, v. 39, p. 25-30, 2010.

16. DROUAL, R.; BICKFORD, A. A.; CHARLTON, B. R.; COOPER, G. L.;CHANNING, S. E. Infectious coryza in meat chickens in the San Joaquin Valley of California. *Avian Diseases*, v. 34, p. 1009-1016, 1990.

17. FUCHS, W.; VEITS, J.; HELFERICH, D.; GRANZOW, H.; TEIFKE, J.P.; METTENLEITER, T.C. Molecular biology of avian infectious laryngotracheitis virus. Veterinary Research, v. 38, p. 261-279, 2007.

18. GAUSON, J.E.; PHILIP, C. J.; WHITHEAR, K. G.; BROWNING, G. F. Lymphocytic infiltration in the chicken trachea in response to *Mycoplasma gallisepticum* infection. *Microbiology*, v. 146, p. 1223-1229, 2000.

19. GAUSON, J.E.; PHILIP, C.J.; WHITHEAR, K.G.; BROWNING, G.F. Age related differences in the immune response to vaccination and infection with *Mycoplasma gallisepticum*. *Vaccine*, v. 24, p. 1687-1692, 2006.

20. GELENCEZEI, E.F.; MARTY, E.W. Studies on a tissue-culture modified infectious laryngotracheitis virus. *Avian Diseases,*v.8, p.105-122, 1964.

21. GUY, J.S.; GARCIA, M. Laryngotracheitis. In: Saif, Y. M. Diseases of Poultry. 12th ed. Chapter 5, p. 137-152, 2008.

22. HAN, M.G.; KIM, S.J. Efficacy of live virus vaccines against infectious laryngotracheitis assessed by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. *Avian Diseases*., v. 47, p. 261-271, 2003.

23. HIPÓLITO, O.; SOARES, L.A.;, PEREIRA, O.A.C.; PINTO, A.A.; BOTTINO, J.A. Isolamento e identificação do vírus da laringotraqueíte infecciosa das galinhas no Brasil. In: Congresso Brasileiro de Microbiologia; Rio de Janeiro, RJ. Brasil. p. 16. 1974.

24. HUGHES, C. S.; WILLIAMS, R. A.; GASKELL, R. M. Latency and reactivation of infectious laryngotracheitis vaccine virus. *Archive of Virology,* v. 121, p. 213-218, 1991.

25. HUMBERD, J.; GARCIA, M.; RIBLET, S.M.; RESURRECCION, R.S.; BROWN, T.P.; Detection of Infectious Laryngotracheitis Virus in Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissues by Nested Polymerase Chain Reaction. *Avian Diseases,* v. 46, p. 64-74, 2002.

26. JOHNSON, D. I.; VAGNOZZI, A.; DOREA, F. Protection Against Infectious Laryngotracheitis by In Ovo Vaccination with Commercially Available Viral Vector Recombinant Vaccines. *Avian Diseases*, v. 54, p. 1251-1259, 2010.

27. ICTVdB Management (2006). 03.019.0.01.001. Infectious bronchitis virus. In: ICTVdB - The Universal Virus Database, version 4. Büchen-Osmond, C. (Ed), Columbia University, New York, USA.

28. ITO, N.M.K.; GAMA, N.M.S.Q.; MIYAJI, C.I.; OKABAYASHI, S.; LIMA, E.M.; BABADOPULOS, P. Diagnóstico da laringotraqueíte infecciosa das galinhas. *Brazilian Journal of Poultry Science*. Suplemento, v. 5, p. 118, 2003.

29. LEE, S.W.; MARKHAM, P.F.; COPPO, M.J.; LEGIONE, A.R.; MARKHAM, J.F.; NOORMOHAMMADI A.H.; BROWNING, G.F.; FICORILLI, N.; HARTLEY, C.A.; DEVLIN, J.M. Attenuated vaccines can recombine to form virulent field viruses. *Science*, v. 337, p.188, 2012.

30. LEY, D. H. *Mycoplasma gallisepticum* infection. In: FADLY, AM.; GLISSON, J.R.; MCDOUGALD, L.R.; NOLAN, L.K.; SWAYNE, D.E.; SAIF, Y.M. Diseases of Poultry. 01 edition. Iowa: Blackwell Publishing, 2008, 807-867 p.

31. OIE Terrestrial Manual 2008. CHAPTER 2.3.5. AVIAN MYCOPLASMOSIS. (Mycoplasma gallisepticum, M. synoviae).

32. OIE Terrestrial Manual 2013. Version adopted by the World Assembly of Delegates of the OIE in May 2013. Chapter 2.3.2. Avian Infectious Bronchitis. http://www.oie.int/fileadmin/-Home/eng/Health_standards/tahm/2.03.02_AIB.pdf.

33. OIE Terrestrial Manual 2014. Version adopted by the World Assembly of Delegates of the OIE in May 2014. OIE Terrestrial Manual 2014 1. Chapter 2.3.3. Avian Infectious Laryngotracheitis. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.03.03_AVIAN_INF_LARYNGO.pdf.

34. OLDONI, I.; GARCÍA, M. Characterization of infectious laryngotracheitis vírus isolates from the United States by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism of multiple genome regions. *Avian Pathology,* v. 36, p. 167-176, 2007.

35. OLDONI, I.; RODRIGUES-AVILA, A.; RIBLET, S.; GARCÍA, M. Characterization of Infectious Laryngotracheitis Virus (ILTV) Isolates from United States by Polymerase Chain Reaction and Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RLFP). *Avian Diseases,* v.52, p. 59-63, 2008.

36. PORTZ, C.; BELTRÃO, N.; FURIAN, T, Q.; MACAGNAN, M.; GRIEBELER, J.; ROSA, C.A.V.L.; COLODEL, E.M.; DRIEMEIER, D.; BACK, A.; SCHATZMAYR, O.M.B.; CANAL, C.W. Natural infection of turkeys by infectious laryngotracheitis virus. *Veterinary Microbiology*, v.131, p. 57-64, 2008.

37. PREIS, I. S.; BRAGA, J. F. V.; COUTO, R. M.; BRASIL, B. S. A. F.;. Martins, N. R.S.; R. ECCO. Outbreak of infectious laryngotracheitis in large multi-age egg layer chicken flocks in Minas

Gerais, Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 33, p. 591-596, 2013.

38. PREIS, I.S.; Fiuza, T.A.L.; Silva, C.C.; COUTO, R. M.; BRAGA, J.F.V.; Martins, N.R.S.; ECCO, R. Pathological, immunohistochemical, and molecular findings in commercial laying hens and in backyard chickens naturally infected with the infectious laryngotracheitis virus. *Revista Brasileira de Ciência Avícola,* v. 16, p. 359-366, 2014.

39. SANDOVAL, V.E.; TERZOLO, H. R.; BLACKALL, P. J. Complicated infectious coryza cases in Argentina. *Avian Diseases*, v.19, p. 672-678, 1994.

40. SAMBERG, Y.; CUPERSTEIN, E.; BENDHEIM, U., ARONOVICI, I. The development of a vaccine against avian infectious laryngotracheitis. IV Immunization of chickens with modified laryngotracheitis vaccine in the drinking water. *Avian Diseases,* v. 15, p.413-417, 1971.

41. SAWATA, A.; NAKAI, T.; KUME, K.; YOSHIKAWA, H. Lesions induced in the respiratory tract of chickens by encapsulated or nonencapsulated variants of *Haemophilus paragallinarum*. *American Journal Veterinary Research,* v. 46, p. 1185-1191, 1985.

42. SELLERS, H.S.; GARCIA, M.; GLISSON, J.R.; BROWN, T.P.; SANDER, J.S.; GUY, J.S. Mild infectious laryngotracheitis in broilers in the southeast. *Avian Diseases*, v.48, p. 430-436, 2004.

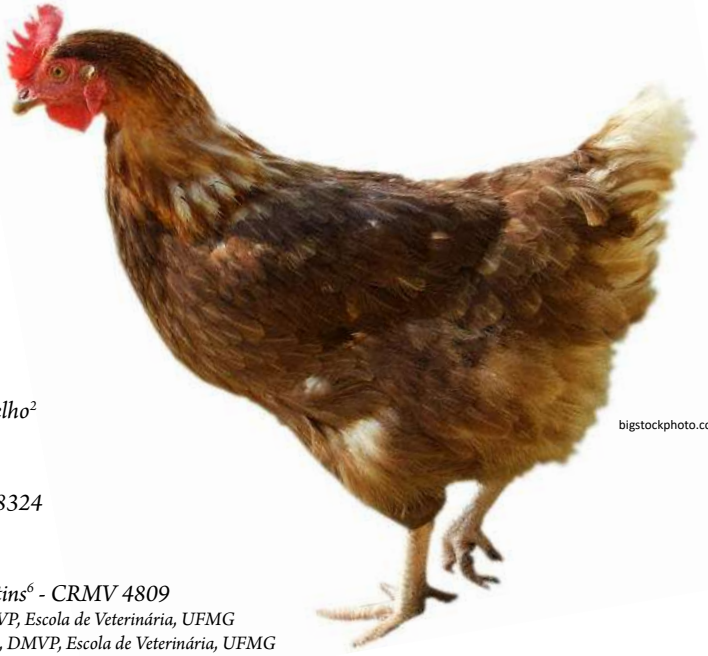
43. TADESE, T.; POTTER, A.E.; FITZGERALD, S.; REED, W.M. Concurrent Infection in chickens with Fowlpox Virus and Infectious Laryngotracheitis Virus as Detected by Immunohistochemistry and a Multiplex Polymerase Chain Reaction Technique. *Avian Diseases*, 51, p. 719-729, 2007.

44. TIMURKAAN, N.; YILMAZ, F.; BULUT, H.; OZER, H.E.; BOLAT, Y. Pathological and Immunohistochemical in Broilers Inoculated with a Low Virulent Strain of Infectious virus. *Journal of Veterinary Science*, v. 4, p. 175-180, 2003.

45. TORO, H.; PENNINGTON, D.; GALLARDO, R.A.; VAN SANTEN, V.L.; VAN GINKEL, F.W.; ZHANG, J.; JOINER, K.S. Infectious bronchitis virus subpopulations in vaccinated chickens after challenge. *Avian Diseases*, v. 56, p. 501-508, 2012.

46. VILLARREAL, L.Y.B,; BRANDÃO, P.E.B.; CHACÓN, J.L.V.; DORETTO JUNIOR, L,; ITO, N.; GAMA, N.S.; ISHIZUKA, M.M.; LUCHESE, A.; BUCHALA, F.; ASTOLFI-FERREIRA, C.S.; FERREIRA, A.J.P. Detection and molecular characterization of infectious laryngotracheitis virus in laying hens in Brazil. *Revista Brasileira de Ciência Avícola,* v. 6, p. 253-256, 2004.

8. Micoplasmoses



bigstockphoto.com

Ana Caroline Doyle Torres[1]
Hannah Luiza Gonsalves Coelho[2]
Sarah Ferreira Cunha[2]
Maurício Resende[3]
Roselene Ecco[4] *- CRMV MG 8324*
Sandra Yuliet Marin[5]
Carolina Fontes Prezotto[5]
Nelson Rodrigo da Silva Martins[6] *- CRMV 4809*
[1] *Mestranda, médica veterinária, DMVP, Escola de Veterinária, UFMG*
[2] *Graduanda em medicina veterinária, DMVP, Escola de Veterinária, UFMG*
[3] *Professor aposentado, médico veterinário, mestre e doutor, DMVP, Escola de Veterinária, UFMG*
[4] *Professora associada, médica veterinária, mestra e doutora, DCCV, Escola de Veterinária, UFMG*
[5] *Doutoranda, médica veterinária, mestra, DMVP, Escola de Veterinária, UFMG*
[6] *Professor associado, médico veterinário, mestre e doutor, DMVP, Escola de Veterinária, UFMG*

Micoplasmoses são infecções causadas por bactérias do gênero *Mycoplasma*, classe Mollicutes, filo Tenericutes, reino Eubacteria (ou super-reino Bacteria), domínio Procarya. Há muitas espécies de micoplasmas descritas em aves, e as mais importantes para as aves industriais são *Mycoplasma gallisepticum (M. gallisepticum)*, *M. synoviae* e *M. meleagridis*, todas de erradicação e vigilância permanente e obrigatória nos plantéis reprodutores, de acordo com o Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA, www.agricultura.gov.br). *M. gallisepticum* e *M. synoviae* estão disseminados na classe Aves e ocorrem em várias espécies de aves das

Há muitas espécies de micoplasmas descritas em aves, e as mais importantes para as aves industriais são Mycoplasma gallisepticum (M. gallisepticum), M. synoviae e M. meleagridis, *todas de erradicação e vigilância permanente e obrigatória nos plantéis reprodutores, de acordo com o Programa Nacional de Sanidade Avícola.*

ordens Anseriformes, Galliformes (incluindo a galinha e o frango industriais), Psittaciformes (papagaios, periquitos), Columbiformes (pombos), Passeriformes (passarinhos) e possivelmente outras ordens de aves. *M. meleagridis* tem grande importância e é de erradicação obrigatória em perus [6, 7].

A transmissão horizontal, da ave infectada para a ave susceptível, ocorre principalmente por aerossóis respiratórios e com proximidade. Os aerossóis atingem principalmente as regiões da conjuntiva ocular, seios paranasais e laringe/traqueia superior. Embora os micoplasmas resistam pouco tempo fora do hospedeiro, há risco de transmissão via fômites com resíduos orgânicos e secreções.

Embora alguns micoplasmas, como *M. gallisepticum*, possam infectar diversas espécies de hospedeiros, a maioria é espécie-específica, com infecção restrita a uma espécie de hospedeiro. Há micoplasmas de plantas, insetos, aves, répteis e mamíferos, incluindo humanos [27, 42].

É importante destacar que as micoplasmoses podem, principalmente, ser subclínicas e clinicamente reveladas por fator interveniente, por exemplo: aplicação de vacina viva contra a bronquite infecciosa ou contra a doença de Newcastle, ou ocorrência de doenças imunossupressoras, como doença infecciosa bursal e/ou anemia das galinhas [27, 42].

Epidemiologia

A transmissão de micoplasmas ocorre tanto vertical como horizontalmente, direta ou indiretamente. A transmissão horizontal, da ave infectada para a ave susceptível, dá-se principalmente por aerossóis respiratórios e com proximidade. Os aerossóis atingem sobretudo as regiões da conjuntiva ocular, os seios paranasais e a laringe/traqueia superior. Embora os micoplasmas resistam pouco tempo fora do hospedeiro, há risco de transmissão via fômites com resíduos orgânicos e secreções. As aves infectadas, com sinais respiratórios ou não, excretam micoplasma por aerossóis respiratórios. *M. gallisepticum* permanece viável nas fezes por um a três dias (20°C), três dias em musselina (malha fina de algodão (20°C), na gema de ovos por 18 semanas a 37°C e seis semanas a 20°C. Nas passagens nasais humanas pode resistir por 24 horas e, no cabelo, por três dias [10]. Foram descritas quatro fases na disseminação horizontal de *M. gallisepticum*, sendo a fase 1 latente por 12-21 dias antes da detecção de anticorpos, a fase 2 com duração de um a 21 dias e crescente expressão clínica em 5-10% do plantel, a fase 3 com duração entre uma semana e 32 dias, com

presença de anticorpos em 90-95% das aves, e a fase 4 entre três e 19 dias e atingindo 100% da população [32]. O aumento da densidade populacional resulta em aumento da transmissibilidade horizontal [27, 42].

As galinhas da avicultura familiar são consideradas potenciais reservatórios de *M. gallisepticum* [31], assim como criações comerciais com idades múltiplas [36] e passeriformes canoros de vida livre [35].

As galinhas da avicultura familiar são consideradas potenciais reservatórios de M. gallisepticum *[31], assim como criações comerciais com idades múltiplas [36] e passeriformes canoros de vida livre [35]. A transmissão vertical decorre da infecção nos reprodutores.*

A transmissão vertical decorre da infecção nos reprodutores. Nessa transmissão, há passagem dos sacos aéreos, que permite a passagem transovariana [27, 42]. Na fêmea, há infecção transovariana, em que os folículos ovarianos são infectados durante a sua formação. No macho, há infecção testicular e contaminação seminal [27, 42]. As maiores taxas de transmissão vertical ocorrem durante a fase aguda com pico de replicação respiratória, contaminado até 50% dos ovos entre três e seis semanas após o desafio. Embora com o tempo pós-infecção haja grande declínio da transmissão vertical, poucas aves positivas asseguram a perpetuação nos plantéis [28]. Dessa forma, é fundamental a identificação, com monitoração em intervalos curtos (duas semanas) das reprodutoras suspeitas e sua retirada da reprodução [41]. A legislação brasileira prevê o teste na puberdade (12 semanas), no início da produção (5%) e permanentemente a cada três meses.

Vetores mecânicos (insetos, equipamentos, pessoas) podem transportar material contaminado com secreções. Vacinas vivas preparadas em ovos sem qualidade para produção de imunobiológicos, ou seja, não SPF (*specific pathogen free* – livre de patógenos específicos), podem conter micoplasmas, além de outros agentes de transmissão vertical.

Sinais clínicos e lesões

As doenças respiratórias de galinhas, perus e outras espécies de aves em criações intensificadas destacam-se por usualmente serem infecções combinadas. A associação de patógenos torna o quadro clínico-patológico mais grave [3, 37]. O ambiente de criação (renovação de ar, poeira em suspensão, temperatura, umidade, etc.) e as variações entre as estirpes de *Mycoplasma* exercem enorme papel no curso e no resultado da doença [43].

Em regiões de granjas de postura

comercial é comum a multiplicidade de idades e origens de aves. O impacto das micoplasmoses pode ser muito variável, de infecções perceptíveis por leve perda em produtividade a graves infecções generalizadas, com participação de outros patógenos.

Mycoplasma gallisepticum

Entre as micoplasmoses, a doença causada por *M. gallisepticum* é a mais grave. A doença crônica respiratória (DCR) é a forma clínica mais comum da infecção por *M. gallisepticum* e caracteriza-se por transtornos respiratórios leves ou moderados e baixa mortalidade. Entretanto, a mortalidade pode chegar a 30% quando agravada por *Escherichia coli* [25, 42].

São manifestações clínicas frequentes: estertores respiratórios, tosse, espirros, redução da produção de ovos, mortalidade embrionária [tipicamente mortalidade embrionária tardia na casca, a morte pré-eclosão de ovo bicado (*pipped embryo*)], mortalidade de pintinhos (e jovens de outras espécies) pós-eclosão, aumento da mortalidade de frangos de corte e aumento das condenações no abatedouro, especialmente por aerossaculite e peritonite (Fig. 1). As micoplasmoses respiratórias, em sua fase mais avançada no curso da doença, são comumente coinfecções com *E. coli*, principalmente em frangos de corte, pelo alto desafio respiratório por inalação da poeira contaminada por fezes. Em perus, *M. gallisepticum* pode causar acúmulo bilateral de exsudato nos seios paranasais (Fig. 2), com ambas as faces aumentadas [25, 42].

Os casos complicados por *Escherichia coli* são muito graves e variam com a patogenicidade da *E. coli* interveniente. As complicações incluem o acúmulo de exsudato caseoso (massa caseosa) sobre as estruturas, vísceras e espaços do tóraco-abdômen, aerossaculite, peritonite, peri-hepatite, pericardite,

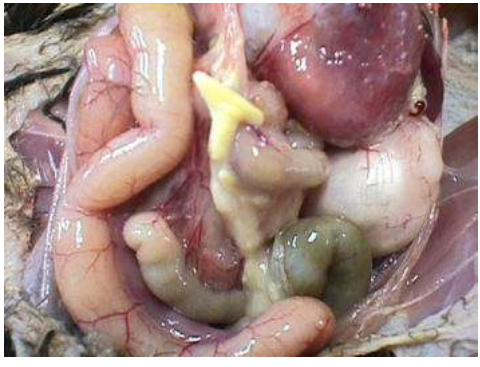


Figura 1. Peritonite caseosa em galinha com micoplasmose por Mycoplasma gallisepticum. Notar grande massa caseosa amarelada na região central da imagem.

Figura 2. Sinusite infecciosa em peru com micoplasmose por Mycoplasma gallisepticum. Notar grande aumento da face e lacrimejamento.

salpingite, além de artrites. A infecção nos reprodutores pode resultar em mortalidade embrionária tardia, de embrião fraco, que bica o ovo mas não consegue sair, e mortalidade de jovens pós-eclosão. O embrião bicado (pipped embryo) e não eclodido pode ter massas caseosas nos sacos aéreos [25, 42].

Doença respiratória grave em frango de corte [48], foi descrita para a estirpe F vacinal, com ganho de virulência após múltiplas passagens em aves [28], foi descrita para a estirpe F vacinal.

M. gallisepticum é caracterizado pelo sinergismo em várias doenças respiratórias de aves industriais por vírus, por exemplo, bronquite infeciosa [25], e bactéria, incluindo coriza infecciosa (*A. paragallinarum*) [3] e colibacilose (*E. coli*) [38, 49].

Atualmente, a genética da avicultura industrial é livre de *M. gallisepticum* e mantida sob erradicação e vigilância obrigatórias dos plantéis de reprodução. Entretanto, a infecção por *M. gallisepticum* foi historicamente um coadjuvante das infecções por vírus respiratórios, como da bronquite infecciosa das galinhas e da doença de Newcastle e, tipicamente, com quadros comumente agravados por *E. coli*. Essas condições ocorrem em regiões com galpões próximos, pobre biosseguridade e proximidade da avicultura familiar.

Em outras espécies de aves, como *Carpodacus mexicanus* e outros passeriformes, e na perdiz de chuckar [25, 27], de vida livre ou cativeiro, *M. gallisepticum* pode causar conjuntivite.

Métodos de amplificação genética e sequenciamento da região de espaço intergênica 16S-23S (IGSR) e da citoadesina (mgc2) permitem a diferenciação de estirpes entre patogênicas e vacinais não patogênicas [1]. No entanto, estudos mostraram que há circulação de estirpes vacinais envolvidas em doença respiratória. Doença respiratória grave em frango de corte [48], foi descrita para a estirpe F vacinal, com ganho de virulência após múltiplas passagens em aves [28], foi descrita para a estirpe F vacinal. As vacinas disponíveis no mercado nacional incluem as estirpes F, TS-11 e MG-70 [39]. Estirpes isoladas em incubatórios no Paraná foram caracterizadas em F, TS-11, R e S6 de *M. gallisepticum*. Estudos realizados no Laboratório de Doenças das Aves [Gomes et al., não publicado] sugerem condição semelhante para estirpes vacinais em Minas Gerais.

Mycoplasma synoviae

As micoplasmoses por *Mycoplasma synoviae* podem resultar em artrite, com aumento articular, inchaço, hiperemia, exsudato leitoso sinovial, claudicação e imobilidade articular. A infecção por *M. synoviae* atinge também o sistema respiratório, e os efeitos clínicos podem também ser dependentes das coinfecções

virais ou bacterianas [25, 42].

Mycoplasma meleagridis e M. iowae

M. meleagridis e *M. iowae* são principalmente patógenos para perus (*Meleagris gallopavo*), resultando em doença respiratória e reprodutiva, com redução da eclodibilidade e com mortalidade embrionária. A transmissão vertical e a infecção embrionária por *M. meleagridis* resultam na doença em jovens logo após a eclosão [9]. Em aves desafiadas mais adiante na vida, e que se recuperam, há resposta imune protetora contra a doença clínica, mas elas se tornam portadoras subclínicas. *M. iowae* tem sido relacionado à redução na eclodibilidade e à mortalidade embrionária em perus, e em infecções experimentais, aerossaculite em perus e galinhas, assim como anormalidades nas pernas [5].

De acordo com o PNSA, os plantéis de espécies de aves comerciais em reprodução devem, obrigatoriamente, ser monitorados para as micoplasmoses alvo de erradicação M. gallisepticum, M. synoviae e M. meleagridis. Em se tratando de galinhas e perus, o material genético das linhagens comerciais deve ser importado livre e mantido em biosseguridade.

Diagnóstico

De acordo com o PNSA, os plantéis de espécies de aves comerciais em reprodução devem, obrigatoriamente, ser monitorados para as micoplasmoses alvo de erradicação *M. gallisepticum*, *M. synoviae* e *M. meleagridis*. Em se tratando de galinhas e perus, o material genético das linhagens comerciais deve ser importado livre e mantido em biosseguridade.

A sorologia rápida em placa (SRP) (Fig. 3), com antígeno colorido específico para cada uma das espécies de micoplasma, é o método oficial recomendado, com a amostragem representativa dos plantéis. O método SRP é sensível, mas pouco específico, e exige reteste dos soros reagentes, por inibição da hemaglutinação (IH) ou ensaio imunoenzimático (ELISA). IH e ELISA são métodos sorológicos em microteste qualitativos e quantitativos, específicos para cada espécie de micoplasma.

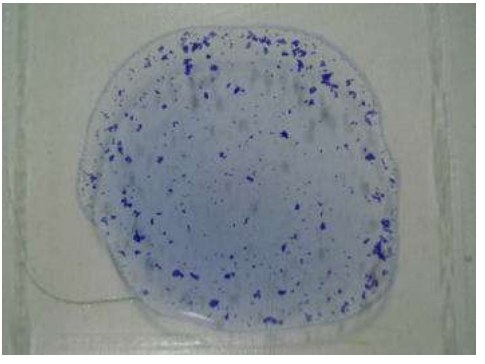


Figura 3. Soroaglutinação rápida em placa com soro reagente para *Mycoplasma gallisepticum*. Os grumos roxos ocorrem devido à reação entre o antígeno colorido e os anticorpos no soro.

O PNSA preconiza, em estabelecimentos de controle permanente (reprodutores elite, bisavós, avós e matrizes), a avaliação periódica a cada três meses, até a eliminação do lote, para galinhas e perus, com início na 12ª semana de idade, por soroaglutinação rápida (SAR) (Fig. 3), de, no mínimo, 300 amostras de soros individuais para *M. gallisepticum* e 100 (cem) amostras para *M. synoviae*, selecionadas aleatoriamente e com amostras de tamanho igual de todos os galpões e ou boxes. Os soros reagentes são retestados por IH ou ELISA. As aves reprodutoras em início de produção, com cerca de 5% de postura, devem ser retestadas por SAR para *M. gallisepticum* (150 amostras por núcleo), e *M. synoviae* (100 amostras por núcleo). As aves reagentes, devem ser confirmadas por IH ou ELISA. Os reagentes por SAR e retestados por IH/ELISA são considerados negativos na diluição até 1:20, suspeitos até 1:40 e positivos até 1:80. Alternativamente, aos 5% de postura, são coletados, no mínimo, dois e, no máximo, seis suabes de traqueia por núcleo e com reteste contínuo a cada quatro meses, para reação em cadeia pela polimerase (PCR) e/ou cultivo. Os suabes traqueais são utilizáveis em aves adultas ou de grande porte e podem ser misturados (*pool*) três a três, com mínimo de dois e máximo de seis por núcleo de mil aves. Há tolerância de variação de até duas semanas, nos intervalos trimestrais ou quadrimestrais, para adequação às outras práticas de manejo. A amostragem para PCR poderá ser de três aves para cada mil, no mínimo 10 e no máximo 20 por núcleo, quando não for possível a coleta por suabe. Os soros de aves de reprodução estacional (sazonal) devem ser amostrados para SAR 30 dias antes da estação de reprodução (postura) e 30 dias após o final da postura. As aves reagentes são retestadas, no mínimo de 20, para confirmação por IH (soro) e PCR e/ou cultivo (suabe). Para perus, os testes devem incluir *M. melleagridis* e *M. iowae*, com as mesmas metodologias e amostragens.

É obrigatória a erradicação de *M. gallisepticum, M. synoviae* e *M. meleagridis* para reprodutores comerciais, sendo proibido qualquer tratamento antibacteriano antes das amostragens de monitoração e vigilância, pois podem interferir nos resultados da sorologia, resultando em falso-negativos, assim como é proibida a vacinação, por resultar em reatividade sorológica.

O isolamento e a identificação de micoplasma podem não ser possíveis em rotina, e são poucos os laboratórios preparados para essa pesquisa. Os meios de cultivo, para evitar o isolamento das outras bactérias e dos fungos presentes, devem conter antibiótico (penicilina) e acetato de

tálio. As colônias de *Mycoplasma* são pequenas e necessitam de visualização ao microscópio. Têm borda e região central que lembram um ovo frito (Fig. 4). Atualmente, as primeiras escolhas para o diagnóstico de micoplasmose e para a caracterização de micoplasmas são os métodos moleculares de amplificação do genoma, por PCR, com oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) específicos. *Primers* para IGSR (16S-23S *intergenic spacer region*) ou para *mgc2*, são usados na caracterização e os produtos de PCR, são avaliados por análise do polimorfismo dos fragmentos de DNA obtidos por enzimas de restrição (RFLP) ou por sequenciamento [18, 42].

Figura 4. Microscopia de colônia (seta) de *Mycoplasma gallisepticum* em meio de Frey et al. (1968). Notar o aspecto característico de "ovo frito". Barra= 1mm.

A política de biosseguridade é necessária para a manutenção do status de livre para os plantéis reprodutores industriais. As granjas devem ser isoladas e sem visitação, com núcleos de produção especializados por origem e idade, com distanciamento e sem fluxo cruzado de pessoal ou veículos.

Prevenção e controle

A biosseguridade é necessária para a manutenção do *status* de livre para os plantéis reprodutores industriais. As granjas devem ser isoladas e sem visitação, com núcleos de produção especializados por origem e idade, com distanciamento e sem fluxo cruzado de pessoal ou veículos.

Os plantéis de estoque genético, elite, bisavós e avós de galinhas, frangos e perus da avicultura industrial, são livres dos micoplasmas descritos no PNSA. Entretanto, pode haver problemas localizados na avicultura de matrizes, precursoras de poedeiras comerciais ou frangos, em granjas estabelecidas há mais tempo, com problemas de biosseguridade, as quais, para controle, devem atender às recomendações do PNSA. Os plantéis comerciais de galinhas de postura, de frangos de corte e de perus têm melhor produtividade ao serem livres de micoplasmose.

No momento da importação, as aves ou os ovos férteis de reprodução e de produção comercial para reposição de plantéis avícolas são amostrados no ponto de ingresso

(aeroporto), e os testes laboratoriais devem atender às normas para importação e exportação de aves e ovos férteis. Para aves de grande porte (ratitas: avestruzes, emas), os ovos importados são transferidos para incubatório previamente habilitado pelo MAPA e, no momento da eclosão, procede-se à coleta de mecônio de ovos bicados, ovos com mortalidade na casca, aves de descarte e suabes de cloaca e de traqueia, para isolamento dos agentes e/ou PCR.

Para poedeiras em regiões endêmicas com múltiplas idades e procedências de galinhas, a vacinação pode representar benefício na produtividade, por redução da manifestação clínica.

Para poedeiras em regiões endêmicas com múltiplas idades e procedências de galinhas, a vacinação pode representar benefício na produtividade, por redução da manifestação clínica. A vacinação com bacterinas (vacinas inativadas) tem a vantagem de não introduzir o risco de reversão das vacinas vivas. Entretanto, a imunidade induzida pode permitir a infecção assintomática com *M. gallisepticum* de campo [21].

Vacinas vivas têm sido empregadas na avicultura de postura brasileira, com o objetivo de reduzir o impacto da micoplasmose na produção de ovos. A estirpe de *M. gallisepticum* F (MG-F) é a mais usada, produzida em estudos de atenuação da estirpe Connecticut F [54], uma estirpe patogênica típica [57].

Vacinas vetorizadas foram desenvolvidas e estão disponíveis tanto no mercado nacional quanto no internacional. HVT (estirpe vacinal contra a doença de Marek) foi preparado como vetor de genes relevantes de *M. gallisepticum* para a indução de proteção ao mesmo tempo contra a doença de Marek e *M. gallisepticum*. A vantagem da vacina vetorizada é a ausência de *M. gallisepticum* e seu potencial risco de reversão de patogenicidade.

Vacinas vetorizadas foram desenvolvidas e estão disponíveis tanto no mercado nacional quanto no internacional. HVT (estirpe vacinal contra a doença de Marek) foi preparado como vetor de genes relevantes de M. gallisepticum para a indução de proteção, ao mesmo tempo contra a doença de Marek e M.

O tratamento pode ser adotado apenas em plantéis comerciais não reprodutores, poedeiras e frangos, com obediência aos prazos, para eliminar o risco de resíduos, para consumo dos produtos e/ou abate, bem como avaliação de custo-benefício. Nas granjas de poedeiras com idades múltiplas, há perpetuação das micoplasmoses, e a intervenção com antibióticos [ti-

losina e azitromicina (macrolídeos) e enrofloxacina (quinolonas)] ou com vacinação pode melhorar os indicadores de produção e reprodução. As vacinas disponíveis contra *M. gallisepticum* para poedeiras comerciais podem melhorar os indicadores de produção de ovos em granjas de múltiplas idades e são produzidas com estirpes, por exemplo, estirpe F de baixa patogenicidade natural, ou mais atenuadas, TS-11 e 6/85.

Referências

1. ARMOUR, N.K., LAIBINIS, V. A., COLLETT, S. R. & FERGUSON-NOEL, N. (2013) The development and application of a Mycoplasma gallisepticum sequence database, Avian Pathology, 42:5, 408-415, DOI: 10.1080/03079457.2013.819486.
2. BLACKALL, P.J. 1999. Infectious Coryza: Overview of the Disease and New Diagnostic Options. Clinical Microbiol Rev. 12, 627-632.
3. BARBOUR E.K., MASTORI F.A., ABDEL NOUR A.M., et al. 2009. Standardization of a new model of H9N2/Escherichia coli challenge in broilers in the Lebanon. Vet Ital. 45: 2, 317-322.
4. BOGUSLAVSKY, S.D.; MENAKER, I.L.; LYSNYANSKY, I. et al. Molecular characterization of the Mycoplasma gallisepticum pvpA gene wich encodes a putative variable cytadhesin protein. Infection and Immunology, v. 68, n. 7, p. 3956-3964, 2000.
5. BRADBURY, J. M.; KLEVEN, S. H. Mycoplasma iowae Infection. . In: Saif, Y.M.; Barnes, H.J.; Fadly, A. M. et al. eds. Diseases of Poultry. Ames: Iowa State University Press. 2003, 11 ed., p. 766-771.
6. BRASIL. Instrução Normativa DAS/n.44 de 23 de agosto de 2001. Aprova sobre as normas técnicas para o controle e a certificação de núcleos e estabelecimentos avícolas para a micoplasmose aviária (*Mycoplasma gallisepticum, Mycoplasma synoviae e Mycoplasma meleagridis*), em conformidade com os Anexos a essa Instrução Normativa. 2009. Diário Oficial da União, Brasília, Distrito Federal. 23/08/2001.
7. BRASIL. Portaria Ministerial nº 193, de 19 de setembro de 1994. Institui o Programa Nacional de Sanidade Avícola do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Diário Oficial da União, Brasília, Distrito Federal. 19/09/1994, Seção 1, p.13.
8. CERDÁ, R.O. Medidas de prevención y control de la micoplasmosis en latinoamérica. In: 20o Congresso Latino Americano Avicultura, Porto Alegre. Anais... Porto Alegre: Centro de Evento Fingers, 2007, p. 111-124.
9. CHIN, R. P.; GHAZIKHANIAN, G. Y.; KEMPF, I. Mycoplasma meleagridis Infection. . In: Saif, Y.M.; Barnes, H.J.; Fadly, A. M. et al. eds. Diseases of Poultry. Ames: Iowa State University Press. 2003, 11 ed., p. 744-756.
10. CHRISTENSEN, N. H., CHRISTINE A. YAVARI, A. J. MCBAIN & JANET M. BRADBURY (1994) Investigations into the survival of Mycoplasma gallisepticum, Mycoplasma synoviae and Mycoplasma iowae on materials found in the poultry house environment, Avian Pathology, 23:1, 127-143, DOI: 10.1080/03079459408418980.
11. FERGUSSON, M.M.; LEITING, V.A.; KLEVEN, S.H. Safety and efficacy of the avirulent Mycoplasma gallisetpticum strain K5054 as live vaccine in poultry. Avian Diseases, v.48, n. 1, p. 91-99, 2004.
12. FREY M.L., HANSON R.P. & ANDERSON D.P. (1968). A medium for the isolation of avian Mycoplasmas. Am. J. Vet. Res., 29, 2163-2171.
13. GHARAIBEH, S.; LAIBINIS, V.; WOOTEN, R. et al. Molecular characterization of Mycoplasma gallisepticum isolates from Jordan. Avian Diseases, v. 55, n. 2, p. 212-216, 2011.
14. GLISSON, J. R.; KLEVEN, S. H. Mycoplasma gallisepticum vaccination: further studies on egg transmission and egg production. Avian Diseases, v. 29, n. 2, p. 408-415, 1985.
15. GOH, M.S.; GORTON, T.S.; FORSYTH, M.H. et al. Molecular and biochemical analysis of a 105 kDa Mycoplasma gallisepticum cytadhesin (GapA). Microbiology, v. 144, n. 11, p. 2971-2978, 1998.
16. HANATOW, L.L.; KEELER JR, C.L.; TESSMER, L.L. et al. Characterization of MGC2, a Mycoplasma gallisepticum cytadhesin with homology to the Mycoplasma pneumoniae 30-kilodalton protein P30 and Mycoplasma genitalium P32. Infection and and Immunology, v. 66, n. 7, p. 3436-3442, 1998.

17. HARASAWA, R. Genetic relationships among mycoplasmas based on the 16S-23S RNA spacer sequence. Microbiology and Immunology, v. 43, n. 2, p. 127-132, 1999.

18. HARASAWA R, MIZUSAWA H, NOZAWA K, NAKAGAWA T, ASADA K, KATO I. Detection and tentative identification of dominant Mycoplasma species in cell cultures by restriction analysis of the 16S-23S rRNA intergenic spacer regions. Res Microbiol 1993; 144 :489-93.

19. KATO, K. 1965. Infectious coryza of chickens. V. Influence of *M. gallisepticum* infection of chickens infected with H. gallinarum. Natl. Inst. Anim. Hlth. 5, 183-189.

20. KLEVEN, S. H. Transmissibility of the F-strain of Mycoplasma gallisetpticum in leghorn chickens. Avians Diseases, v. 25, p. 1005-1018, 1981.

21. KLEVEN, S. H. 1985. Tracheal populations of Mycoplasma gallisepticum after challenge of bacterin-vaccinated chickens. Avian Dis 29:1012-7.

22. KLEVEN, S. H. Control of avian Mycoplasma infections in comerical poultry. Avian Diseases. v. 52, n. 3, p. 367-374, 2008.

23. LAUERMAN, L.H., HOERR, F.J., SHARPTON, A.R., et al. 1993. Development and application of a polymerase chain reaction assay for Mycoplasma synoviae. Avian Dis. 37:3, 829-834.

24. LAUERMAN, L.H.; CHILINA, A.R.; CLOSSER, J.A. et al. Avian Mycoplasma identification using polymerase chain reaction amplicon and restriction fragment length polymorphism analysis. Avian Diseases, v. 39. n. 4, p. 804-811, 1995.

25. LEY, D. H. Mycoplasma gallisepticum infection. In: Saif, Y.M.; Barnes, H.J.; Fadly, A. M. et al. eds. Diseases of Poultry. Ames: Iowa State University Press. 2003, 11 ed., p. 722-744.

26. LEY, D.H.; AVAKIAN, A.P.; BEKHOFF, J.E. Clinical Mycoplasma gallisepticum infection in multiplier breeder and meat turkeys caused by F strain: identification by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, restriction endonuclease analysis, and the polymerase chain reaction. Avian Diseases, v. 37, n. 3, p. 854-862.1993.

27. LEY, D. H., J. E. BERKHOFF, and J. M. MCLAREN. 1996. Mycoplasma gallisepticum isolated from house finches (Carpodacus mexicanus) with conjunctivitis. Avian Dis 40:480-3.

28. LIN, M. Y. and S. H. KLEVEN. 1982. Egg transmission of two strains of Mycoplasma gallisepticum in chickens. Avian Dis 26:487-95.

29. LIN, M.Y.; KLEVEN, S.H. 1984. Evaluation of attenuated strains of Mycoplasma gallisepticum as vaccines in young chickens. Avian Diseases, v. 28, n. 1, p. 88-99.

30. LOCKABY S.B., HOERR F.J., LAUERMAN L.H., et al. 1998. Pathogenicity of Mycoplasma synoviae in broiler chickens. Vet Pathol. 35:3, 178-190.

31. MCBRIDE, M. D., D. W. HIRD, T. E. CARPENTER, K. P. SNIPES, C. DANAYE-ELMI, and W. W. UTTERBACK. 1991. Health survey of backyard poultry and other avian species located within one mile of commercial California meat-turkey flocks. Avian Dis 35:403-7.

32. MCMARTIN, D. A., M. I. KHAN, T. B. FARVER, and G. CHRISTIE. 1987. Delineation of the lateral spread of Mycoplasma gallisepticum infection in chickens. Avian Dis 31:814—819.

33. METTIFOGO, E.; BUZINHANI, M.; BUIM, M.R. et al. Molecular characterization of Mycoplasma gallisepticum isolates using RAPD and PFGE isolated from chickens in Brazil. Journal of Veterinary Medicine B - Infectious Diseases and Veterinary Public Health, v. 53, n. 9, p. 445-450, 2006.

34. METTIFOGO, E.; FERREIRA, A. J. P. Micoplasmose aviária. Andreatti Filho, R. L. Saúde Aviária. São Paulo: Roca, p. 147-151, 2006.

35. MIKAELIAN, I., D. H. LEY, R. CLAVEAU, and M. LEMIEUX. 2001. Mycoplasma gallisepticum from evening grosbeaks and pine grosbeaks with conjunctivitis in Quebec, Canada. J Wildl Dis In press.

36. MOHAMED, Y.S., MOORHEAD, P.D., BOHL, E.H. 1969. Preliminary observations on possible synergism between infectious laryngotracheitis virus and Hemophilus gallinarum. Avian Dis. 13:1, 158-162.

37. MOHAMMED, H.O., CARPENTER, T.E., YAMAMOTO, R. 1987. Economic impact of Mycoplasma gallisepticum and M. synoviae in commercial layer flocks. Avian Dis. 31, 477-482.

38. MOHAMMED, H. O., T. E. CARPENTER, R. YAMAMOTO, and D. A. MCMARTIN. 1986. Prevalence of Mycoplasma gallisepticum and M. synoviae in commercial layers in southern and central California. Avian Dis 30:519-26.

39. NASCIMENTO, E.R. POLO P. A., PEREIRA V.L.A., et al. 2006. Serologic Response of SPF Chickens to Live Vaccines and other Strains of Mycoplasma gallisepticum. Rev Bras de Cienc Av. 8:1, 45-50.

40. NASCIMENTO, E.R.; PEREIRA, V.L.A. Micoplasmoses. In: Berchieri Jr, A.; Macari, M. et al., ed. Doenças das aves. Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícola, 2009, p. 485-502.

41. National Poultry Improvement Plan and Auxiliary Provisions. 1982. Publication APHIS 91-55-031. Animal and Plant Health Inspection Service, U.S. Department of Agriculture: Hyattsville, MD, 59-72.

42. OIE - Office International des Epizooties. Terrestrial Manual 2008, Chapter 2.3.5. – Avian mycoplasmosis (Mycoplasma gallisepticum, M. synoviae).

43. PAPAZISI, L., FRASCA S., GLADD, M., et al. 2002. GapA and CrmA Coexpression Is Essential for Mycoplasma gallisepticum Cytadherence and Virulence. Infec and immune. 70:12, 6839-6845.

44. RAVIV Z, CALLISON S, FERGUSON-NOEL N, LAIBINIS V, WOOTEN R, KLEVEN SH. 2007. The Mycoplasma gallisepticum 16S-23S rRNA intergenic spacer region sequence as a novel tool for epizootiological studies. Avian Dis.51:2, 555-60.

45. RAVIV, Z.; CALLISON, S.; FERGUSON-NOEL, N. et al. The Mycoplasma gallisepticum 16S-23S rRNA intergenic spacer region sequence as a novel tool for epizootiological studies. Avian Diseases, v. 51, n. 2, p. 555-560, 2007.

46. RAZIN, S.; YOGEV, D.; NAOT, Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasma. Microbiology and Molecular Biology Reviews, v. 62, n. 4, p. 1094-1156, 1998.

47. RECK C., MENIN A., CANEVER M.F., et al. 2013. Rapid detection of Mycoplasma synoviae and avian reovirus in clinical samples of poultry using multiplex PCR. Avian Dis. 57:2, 220-224.

48. RODRIGUEZ, R.; KLEVEN, S.H. Pathogenicity of two strains of Mycoplasma gallisepticum in broiler chickens. Avian Diseases, v. 24, n. 4, p. 800-807, 1980.

49. SMITH, H.W., COOK, J.K.A. & PARSELL, Z.E. (1985). The experimental infection of chickens with mixtures of infectious bronchitis virus and Escherichia coli. Journal of General Virology, 66, 777-786.

50. STIPKOVITS L., KEMPFT I. 1996. Mycoplasmosis in poultry. Rev. Off. Int. Epizoot, 15, 1495-1525.

51. TAMURA ,K.; PETERSON, D.; PETERSON, N. et al. MEGA5: molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. Molecular Biology and Evolution, v.28, n. 10, p. 2731-2739, 2011.

52. TULLY, J.G. Cloning and filtration tecnhiques for mycoplasmas: mycoplasma. In: Razin, S.; Tully, J.G. eds. Methods in mycoplasmology. San Diego: Academic Press, v. 1, 1995b, p. 173-177.

53. TULLY, J.G. Culture medium formulation for primary isolation and maintenance of molicutes in molecular and diagnostic procedures in mycoplasmology. In: Razin, S; Tully, J. G., eds. Methods in mycoplasmology. San Diego: Academic Press, v. 1, 1995a, p. 33-39.

54. VAN DER HEIDE, L. 1977. Vaccination can control costly chronic respiratory disease in poultry. Research Report, Conn Storrs Agric Exp Stn 47:26.

55. VOLOKHOV, D.V.; GEORGE, J.; LIU, S.X. et al. Sequencing of the intergenic 16S-23S rRNA spacer (ITS) region of Mollicutes species and their identification using microarray-based assay and DNA sequencing. Applied Microbiology Biotechnology, v.71, n.5, p. 680-698, 2006.

56. WOSE, C.R.; STACKEBRANDT, E., LUWIG, W. What are mycoplasmas: the relationship of tempo and mode in bacterial evolution. Journal of Mollecular Evolution. v. 21, n. 4, p. 305-316, 1985.

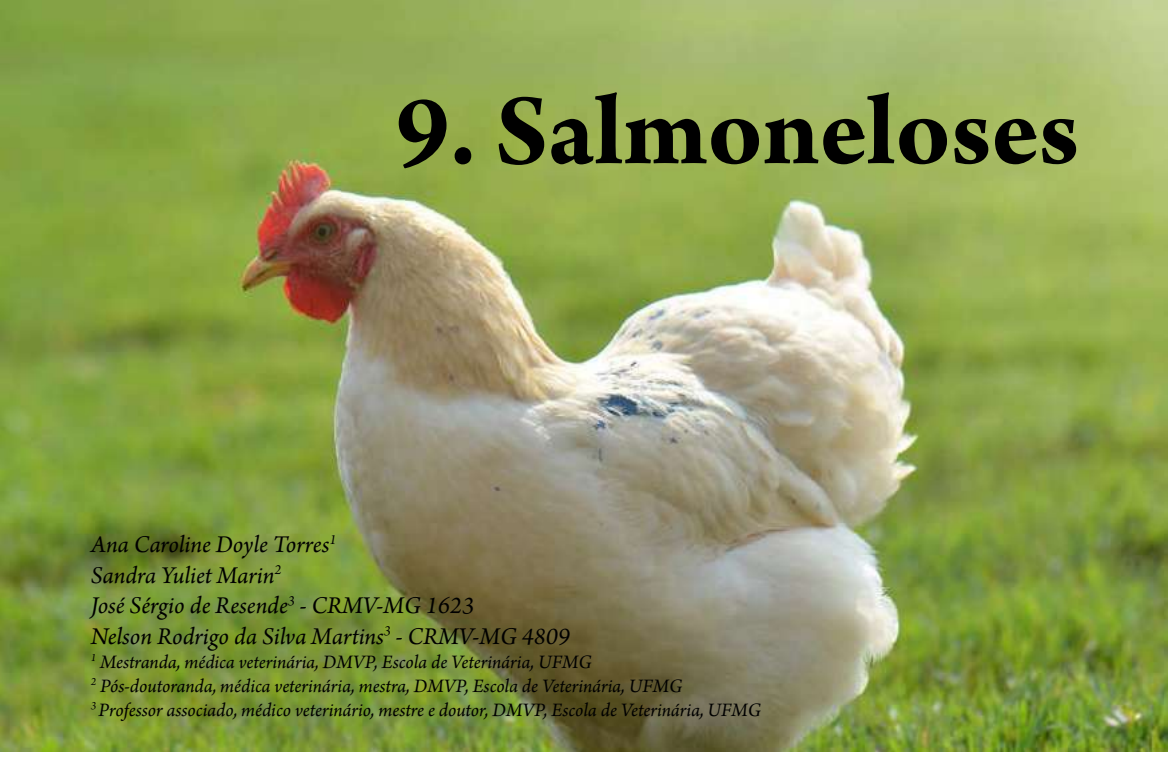
57. YAMAMOTO, R. and H. E. ADLER. 1956. The effect of certain antibiotics and chemical agents on pleuropheumonia-like agents of avian origin. Am J Vet Res 17:538—542.

58. YODER JR, H. W. Mycoplasma gallisepticum infection. In: Calnek et al. eds. Diseases of Poultry. Ames: Iowa State University Press. 1991, 9 ed., p 198-212.

59. YOSHIDA, S.A.; FUJISAWA, Y.; TSUZAKI, Y. et al. Identification and expression of a Mycoplasma gallisepticum surface antigen recognized by a monoclonal antibody capable of inhibiting both growth and metabolism. Infection and Immunology, v. 68, n. 6, p. 3186-3192, 2000.

60. ZAIN, Z.M.; BRADBURY, J.M. Optimising the conditions for isolation of Mycoplasma gallisepticum collected on applicator swabs. Veterinary Microbiology, v. 49, n. 1, p. 45-57, 1996.

9. Salmoneloses



Ana Caroline Doyle Torres[1]
Sandra Yuliet Marin[2]
José Sérgio de Resende[3] *- CRMV-MG 1623*
Nelson Rodrigo da Silva Martins[3] *- CRMV-MG 4809*
[1] *Mestranda, médica veterinária, DMVP, Escola de Veterinária, UFMG*
[2] *Pós-doutoranda, médica veterinária, mestra, DMVP, Escola de Veterinária, UFMG*
[3] *Professor associado, médico veterinário, mestre e doutor, DMVP, Escola de Veterinária, UFMG*

bigstockphoto.com

Salmoneloses são infecções por bactérias do gênero Salmonella. As salmoneloses mais importantes no que tange à saúde das aves da avicultura industrial (galinha e peru) são o tifo aviário (*Salmonella enterica enterica* biovar Gallinarum) e a pulorose (*Salmonella enterica enterica* biovar Pullorum). Ambas foram erradicadas da genética das galinhas e dos perus industriais, tendo em vista as doenças graves que causam nessas espécies. Atualmente, ambas são consideradas sorovariedade única S. Gallinarum-Pullorum (SGP) [4]. O Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA) determina a norma sanitária para aves industriais, galinhas, perus e outras espécies no Brasil [3]. As sorovariedades de maior importância à saúde pública são Salmonella Typhimurium e S. Enteritidis e também alvo de controle oficial. Em humanos, outras sorovariedades estão adquirindo relevância, como S. Newport [3]. O PNSA estabelece, em legislação própria, as normas de qualidade para a avicultura industrial, para o controle das doenças de impactos econômicos e sociais mais importantes [3].

As salmoneloses podem resultar em doença superaguda ou crônica em aves de todas as idades. As galinhas de subsistência ou de fundo de quintal são comumente infectadas, e, por sua rusticidade, algumas podem sobreviver em surtos de tifo e pulorose, podendo

permanecer portadoras, com transmissão via transovariana para a progênie. As salmonelas do grupo paratifo são móveis e transmitidas através da casca do ovo contaminado [17].

Há pouco e quase nenhum significado de SGP em saúde pública. Em 10 anos, entre 1982-1992, de mais de 458.000 isolados de Salmonella de toxi-infecção alimentar em humanos, apenas 26 foram identificados como SGP [3].

As salmoneloses são doenças causadas por bactérias do gênero Salmonella*, sendo, em aves domésticas, mais importantes o tifo aviário, doença septicêmica principalmente de adultos, e pulorose, doença sistêmica principalmente de jovens.* Salmonella Arizonae *causa doença semelhante à pulorose em pintinhos e peruzinhos.*

Etiologia

As salmoneloses são doenças causadas por bactérias do gênero Salmonella, sendo, em aves domésticas, mais importante a sorovariedade de Salmonella Gallinarum-Pullorum, causadora do tifo aviário, doença septicêmica de adultos, e pulorose, doença septicêmica de pintinhos ou peruzinhos após a eclosão. Salmonella Arizonae causa doença semelhante à pulorose em pintinhos e peruzinhos. Entre as infecções por outras sorovariedades (grupo paratifo), têm especial importância Salmonella typhimurium (S. Typhimurium) e S. enteritidis (S. Enteritidis), por sua ocorrência em toxi-infecções alimentares em humanos e com pouco ou apenas leve impacto clínico em aves antes das duas semanas de idade. Entre as milhares de sorovariedades (>2.500) de Salmonella, todas podem ter alguma importância em saúde pública, por infectarem a ave e o produto avícola de consumo humano, carne e ovos, especialmente de plantéis sem adequada monitoração [2, 3, 4, 13, 17]. Nos produtos de consumo de aves industriais, a tolerância é zero e todas as partidas são amostradas para o gênero Salmonella, juntamente com outros gêneros importantes, como Campylobacter, Escherichia, e Listeria [3].

Classificação

As salmonelas pertencem à família Enterobacteriaceae, gênero Salmonella, em homenagem ao bacteriologista veterinário Daniel E. Salmon, do United States Department of Agriculture (USDA). São bastonetes Gram-negativos aeróbios e anaeróbios facultativos e, em sua maioria, móveis por flagelos, com exceção da sorovariedade Gallinarum-Pullorum, que é imóvel, não possuindo flagelos. A espécie

Salmonella enterica contém seis subespécies, sendo importante para aves a subespécie de animais de sangue quente, S. enterica enterica. Estão listadas no PNSA Salmonella enterica enterica sorovariedade Pullorum (S. Pullorum), S.e.e. sorovariedade Gallinarum (S. Gallinarum), S.e.e. Typhimurium (S. Typhimurium) e S.e.e. Enteritidis (S. Enteritidis). Mais de 2.500 sorovariedades foram caracterizadas, e o número continua crescendo. Algumas sorovariedades são hospedeiro–específicas, e muitas ocorrem em múltiplos hospedeiros, embora todas sejam patógenos potenciais de humanos. O PNSA determina a vigilância e a erradicação de focos de Salmonella enterica enterica sorovariedade Pullorum (S. pullorum), S.e.e. sorovariedade Gallinarum (S. gallinarum), S.e.e. Typhimurium (S. typhimurium) e S.e.e. Enteritidis (S. enteritidis) [3]. Houve a recente unificação de S. Gallinarum e S. Pullorum na sorovariedade S. Gallinarum-Pullorum (SGP) [13, 17].

Transmissão e doença

A pulorose (S. Pullorum) e o tifo aviário (S. Gallinarum) são doenças septicêmicas principalmente das espécies das galinhas (postura e corte) e dos perus. Embora outras espécies de hospedeiros tenham sido descritas, como a codorna, o faisão, a galinha- d'angola e o pavão, a sorovariedade Gallinarum-Pullorum é considerada muito restrita aos hospedeiros principais, com rara manifestação clínica em outras espécies [17]. A transmissão de pulorose e tifo pode ser vertical e horizontal. No ovário, há infecção transovariana de folículos, que resulta em anomalias foliculares com número crescente de folículos alterados, embora se mantenham folículos normais por um longo período de transmissão.

A pulorose é forma septicêmica de aves jovens e tem forte associação com a infecção transovariana na fêmea infectada. A fêmea transmissora é principalmente assintomática na fase de transmissão. A detecção de anticorpos por soroaglutinação rápida com antígeno colorido [15] foi a metodologia de detecção da infecção em galinhas portadoras iniciada no final dos anos 1930, em uma época em que pulorose era devastadora, com até 100% de mortalidade nos Estados Unidos. A pulorose foi primeiramente denominada diarreia branca bacilar, pela presença de diarreia branca, aderência de fezes brancas ao redor e na cloaca e pela presença de bastonete bacteriano. A gravidade de pulorose e a inviabilização da avicultura forçaram a criação de planos de erradicação nos Estados Unidos da América [7, 15], sendo logo ampliados para combater também o tifo aviário. As salmonelas causadoras de doença em aves domésticas S. gallinarum (ou S. Gallinarum) e S. pullorum (ou S. Pullorum) têm transmissão transovariana, principalmente por infecção do óvulo durante a ovula-

ção para o infundíbulo.

A galinha portadora pode transmitir S. pullorum para 1/3 da progênie (via vertical de transmissão). O pintinho que eclode infectado por S. pullorum transmite a infecção no nascedouro e, durante a cria, via fecal-oral (via horizontal de transmissão). Progênies infectadas no ovário/infundíbulo (via vertical) apresentam clinicamente pulorose septicêmica desde o primeiro dia de vida, com infecção sistêmica, fraqueza, prostração, diarreia, desidratação e tampão de fezes na cloaca. A transmissão horizontal para os demais em convívio resulta no surgimento da doença generalizada em poucos dias [13, 17].

O tifo aviário é a forma septicêmica em adultos, caracterizada pela morte súbita de aves de aspecto prévio saudável. Apesar de o tifo aviário (S. gallinarum) poder ocorrer em jovens e seus efeitos negativos serem importantes desde a eclosão, a doença típica ocorre em adultos. O tifo aviário pode ser doença superaguda em adultos, com a morte súbita de aves de aspecto saudável. As aves com infecção mais prolongada podem apresentar ooforite (Fig. 1), a infecção do ovário, que gradualmente as torna inférteis. Durante o processo gradual de infecção ovariana, há, entretanto, a formação de folículos normais e a geração de progênie viável, que garante a transmissão vertical. Para aves em convívio, após a eclosão haverá a transmissão horizontal. Em ambas as salmonelas, à necrópsia, podem ser observadas esplenomegalia (Fig. 2), hepatomegalia e focos de necrose hepática (Fig. 2). O fígado pode apresentar uma tonalidade verde-escura.

Há pouca importância de SGP em saúde pública. Entre 1982-1992, a identificação de mais de 458.000 isolados de Salmonella de toxi-infecção alimentar em humanos nos Estados Unidos da América resultou em apenas 26 estirpes

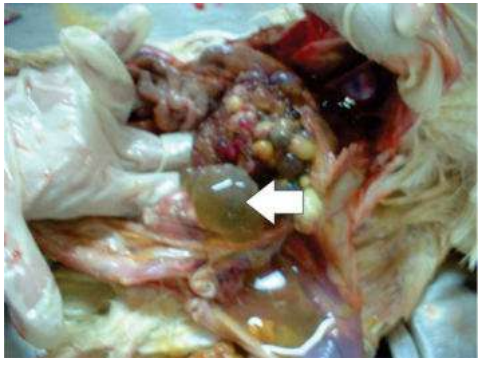


Figura 1. Ovário com degeneração folicular. Neste caso, os folículos anômalos têm cor esverdeada, deformidade e acumulação de líquido (seta).

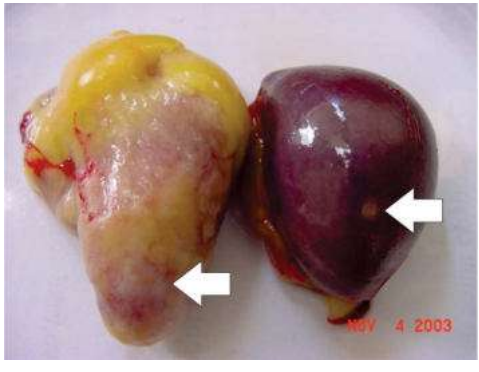


Figura 2. Coração com focos de necrose e baço aumentado. Os focos de necrose são áreas mais claras ou brancas. No baço, veem-se focos de necrose (seta).

identificadas como SGP [13, 17]. As demais salmonelas, mais de 1.400 sorovariedades do grupo paratifo, por exemplo S. Typhimurium e S. Enteritidis, são principalmente transmitidas através da casca do ovo, durante a passagem pela cloaca ou logo após a postura [13, 17]. A Anvisa e o Mapa avaliam regularmente, por amostragem, a qualidade do produto de origem animal. No relatório da Anvisa de 2008, foi encontrada a presença de Salmonella (49% S. Enteritidis, 7,2% S. Typhimurium e 4,8% S. MBandaka) em 4% da carne de frango (Fig. 3) [2].

Fatores moleculares de virulência bacteriana estão sendo caracterizados. Por exemplo: proteínas determinantes de virulência em bactérias Gram-negativas, como as codificadas pelo gene de invA, atuam desviando processos bioquímicos celulares em favor do patógeno. Uma nanosseringa (sistema secretório de proteína tipo III – T3SS) transloca proteínas da bactéria através da membrana celular, permitindo a entrada no citoplasma de fatores de virulência celular. Em outras palavras, T3SS atua como uma seringa molecular que inocula proteínas efetoras de patogenicidade [11].

A proteção contra S. Enteritidis foi avaliada experimentalmente, sugerindo que heterófilos (granulócito polimorfo-

Sorovar	N Sorovar	%
S. Enteritidis	122	48,8
S. Typhimurium	18	7,2
s. Mbandaka	12	4,8
S.Give	5	2
S.Heidelberg	16	6,4
S.Infantis	19	7,6
S.Rissen	8	3,2
S.Newport	2	0,8
S.Panama	5	2
S.Agona	9	3,6
S.Schwarzenground	3	1,2
S.Senftenberg	3	1,2
S.Minnesota	3	1,2
S.Lexigton	2	0,8
S.Ohio	3	1,2
S.Gaminara	1	0,4

Figura 3. Ocorrência de sorovariedades de *Salmonella enterica enterica* em carne de frango. Relatório Prebaf, Anvisa, 2008 [2].

nuclear equivalente ao neutrófilo) são fundamentais no combate inicial e na redução da patogênese [10]. A proteção é mediada por peptídeos antimicrobianos, óxido nitroso e compostos oxidativos [6]. No início da infecção intestinal, a imunidade inata é ativada e desencadeia influxo de heterófilos e macrófagos para o local, reduzindo significativamente a invasibilidade da salmonela, embora podendo resultar em eventual dano autoimune. A perda dos heterófilos pode modificar a evolução e o prognóstico, de infecção localizada no sistema gastrintestinal para doença sistêmica fatal. A invasão é um processo inflamatório, com expressão de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas CXCLi1 e CXCLi2 (equivalentes à IL-8 de mamíferos). O influxo intestinal de heterófilos e monócitos fagocitários resulta em inflamação e dano às vilosidades (fusão e achatamento), com secreções bacterianas SPI1 tipo III. O reconhecimento da flagelina por TLR5 (toll-like receptor 5) é elemento chave na estimulação da imunidade inata, e sorovariedades de Salmonella sem flagelina induzem pouca inflamação [5, 8, 9, 19, 20].

Diagnóstico

A doença por SGP em jovens logo após a eclosão ou com poucos dias de idade, caracterizada por diarreia branca, com tamponamento cloacal por fezes (brancas) na pulorose, ou doença com morte aguda/superaguda em adultos no tifo aviário podem ser motivos de suspeita [13, 17]. Para o diagnóstico sorológico, as aves são testadas por soroaglutinação rápida (SRP; anticorpos no soro) (Fig. 4), e as aves reagentes (máximo de 10) são amostradas para confirmação por isolamento e identificação bacteriana. Dessas aves devem ser coletados, com material cirúrgico autoclavado, para bacteriologia, fígado, baço ovário, saco vitelino, os quias devem ser embalados separadamente em sacos plásticos ou frascos próprios e enviados em caixa isotérmica com gelo reciclável, para confirmação laboratorial [3, 13, 17].

O diagnóstico de *Salmonella* pode ser feito pela detecção do DNA bacteriano. A amplificação de parte do gene invA, descrita primeiramente para Salmonella Typhimurium [13], em reações em cadeia pela polimerase (PCR) é considerada um método universal para a detecção do gênero (Salmonella spp.). Para a determinação da sorovariedade,

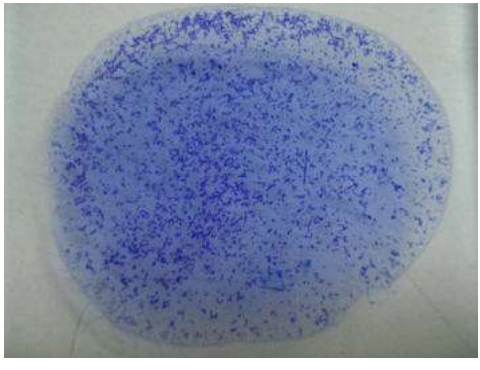


Figura 4. Reação sorológica para pulorose-tifo aviário. Soro reagente em sorologia rápida em placa com antígeno colorido (grumos roxos).

o produto obtido deve ser sequenciado.

Para o diagnóstico das infecções por Salmonella de importância em saúde pública, amostras de poedeiras de ovos de consumo em estabelecimentos com galpões californianos, clássico ou modificado, por sua maior exposição ao desafio, devem ser coletados 300 gramas de fezes frescas por galpão do núcleo, preferencialmente cecais, coletadas em diferentes pontos distribuídos ao longo do galpão e reunidas em uma única amostra. Alternativamente, devem ser coletados quatro suabes de arrasto ou dois pares de propés, agrupados em um pool, umedecidos com meio de conservação, e cada suabe ou par de propés deve perfazer 50% da superfície do galpão. Os suabes e propés devem ser umedecidos com meio de conservação e transporte, podendo ser água peptonada tambonada 1%, meio de Cary e Blair, solução salina fisiológica ou solução de Ringer diluída a ¼ [12].

Prevenção e controle

De acordo com o PNSA, são de vigilância e erradicação obrigatórias para aves reprodutoras as salmoneloses causadas por S. pullorum, S. gallinarum, S. typhimurium e S. enteritidis [3, 12]. O tratamento e a vacinação contra as salmoneloses são proibidos para reprodutores na avicultura industrial, e o Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA) determina a erradicação das quatro principais sorovariedades (S. gallinarum, S. pullorum, S. typhimurium e S. enteritidis) dos plantéis reprodutores da avicultura tecnificada, por seu impacto econômico e em saúde pública. Entretanto, em ocasiões especiais, poderá ser utilizada a vacina contra S. enteritidis em matrizes, sob a coordenação do Mapa. Todas as estratégias de biosseguridade e monitoração devem ser implementadas para garantir a manutenção do status de livres nos plantéis comerciais.

Os estabelecimentos avícolas de postura comercial descritos na Instrução Normativa nº. 10 devem manter alojadas somente aves vacinadas, com vacinas vivas para S. Enteritidis [12]. Poedeiras comerciais de ovos de consumo humano, criadas em estabelecimentos avícolas de postura comercial com galpões do tipo californiano, clássico ou modificado, por sua maior exposição ao desafio, devem ser vacinadas contra S. Enteritidis, para a redução da infecção de ovos. A vacina viva de S. Enteritidis deve ser aplicada no incubatório ou na recria.

Todos os plantéis devem ser submetidos à vigilância epidemiológica para S. Enteritidis, S. Typhimurium e S. Gallinarum-Pullorum com coletas de amostras para testes laboratoriais [12].

O despovoamento, a eliminação de galinhas e de outras aves domésticas da propriedade e o combate permanente aos ratos são essenciais para a erradicação da doença. O combate a um surto

de S. Pullorum em poedeiras vermelhas com septicemia aguda foi descrito nos Estados Unidos da América (Iowa) e pode servir de ilustração para as medidas necessárias no enfrentamento em criações de avicultura familiar. As aves foram necropsiadas, e enviados tecidos/secreções para diagnóstico laboratorial. Ratos foram capturados em armadilhas, e a presença de S. Pullorum foi demonstrada por isolamento dos intestinos. Além da granja afetada, demonstraram-se anticorpos por SRP com sangue total e antígeno colorido em uma galinha e dois patos em granja próxima. Eletroforese de campo pulsado demonstrou semelhantes perfis de migração para S. Pullorum, indicando semelhança genética dos isolados das galinhas, dos patos e dos ratos na granja afetada e na vizinha, possivelmente de origem comum. A depopulação, a limpeza, o vazio sanitário e a captura de ratos permitiram a erradicação da estirpe de Salmonella Pullorum responsável [1].

Referências

1. ANDERSON LA, DA MILLER and DW TRAMPEL. Epidemiological investigation, cleanup and eradication of pullorum disease in adult chickens and ducks in two small-farm flocks. Avian Dis (2006) 50: 142-147.

2. ANVISA, Relatório de pesquisa em vigilância sanitária de alimentos. 2008. http://www.anvisa.gov.br/alimentos/relatorios/relatorioprebaf.pdf.

3. BRASIL. Manual de Legislação. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Programas Nacionais de Saúde Animal do Brasil. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Saúde Animal, Brasília. 2009. http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Aniamal/Manual%20de%20Legisla%C3%A7%C3%A3o%20-%20Sa%C3%BAde%20Animal%20-%20low.pdf.

4. CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Salmonella Surveillance, Annual Summary. (1992): Atlanta, GA, USA.

5. CHAPPELL L, KAISER P, BARROW P, JONES MA, JOHNSTON C, WIGLEY P. The immunobiologyof avian systemic salmonellosis. Vet Immunol Immunopathol (2009) 128:53–9. doi:10.1016/j.vetimm.2008.10.295.

6. CHUAMMITRI P, OSTOJIC J, ANDREASEN CB, REDMOND SB, LAMONT SJ, PALIC D. Chicken heterophil extracellular traps (HETs): novel defense mechanism of chicken heterophils. Vet Immunol Immunopathol (2009) 129:126–31. doi:10.1016/j.vetimm.2008.12.013.

7. EASTERN STATES CONFERENCE ON LABORATORY WORKERS IN PULLORUM DISEASE CONTROL. J Am Vet Med Assoc (1930), 77:259—263.

8. IQBAL M, PHILBIN VJ, WITHANAGE GS, WIGLEY P, BEAL RK, GOODCHILD MJ, et al. Identification and functional characterization of chicken toll-like receptor 5 reveals a fundamental role in the biology of infection with Salmonella enteric serovar Typhimurium. Infect Immun (2005) 73:2344-50. doi:10.1128/IAI.73.4. 2344-2350.

9. KAISER P, ROTHWELL L, GALYOV EE, BARROW PA, BURNSIDE J, WIGLEY P. Differential cytokine expression in avian cells in response to invasion by Salmonella typhimurium, Salmonella enteritidis and Salmonella Gallinarum. Microbiology (2000) 146(Pt 12):3217-26.

10. KOGUT MH, TELLEZ GI, MCGRUDER ED, HARGIS BM, WILLIAMS JD, CORRIER DE, et al. Heterophils are decisive components in the early responses of chickens to Salmonella enteritidis infections. Microb Pathog (1994) 16:141-51.

11. LILIC M, QUEZADA C.M., STEBBINS C.E.. A conserved domain in type III secretion links the cytoplasmic domain of InvA to elements of the basal body. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. (2010) 66 (Pt 6):709-13.

12. MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Instrução Normativa nº. 10, de 11 de abril de 2013, Defesa Agropecuária, Brasília, DF, 2013.

13. MAPA. Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Manual de Legislação. Programas Nacionais de Saúde Animal do Brasil. Brasília, DF, 2009. Baixado de: http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Aniamal/Manual%20de%20Legisla%C3%A7%C3%A3o%20-%20Sa%C3%BAde%20Animal%20-%20low.pdf.

14. OIE, Office International dês Epizooties. Terrestrial Manual. FOWL TYPHOID AND PULLORUM DISEASE. Chapter 2.3.1.1. Version adopted by the World Assembly of Delegates of the OIE in May 2012.

15. RAHN K, GRANDIS SA-DE, CLARKE RC, MCEWEN SA, GALAN JE, GINOCCHIO C, CURTISS R, GYLES CL. Amplification of an invA gene sequence of Salmonella typhimurium by polymerase chain reaction as a specific method of detection of Salmonella. Mol Cellular Probes. (1992) 6:271-279.

16. REPORT OF THE CONFERENCE OF OFFICIAL RESEARCH WORKERS IN ANIMAL DISEASES OF NORTH AMERICA ON STANDARD METHODS OF PULLORUM DISEASE IN BARNYARD FOWL. J Am Vet Med Assoc (1930), 82:487-491.

17. SCHAFFER, J. M., A. D. MACDONALD, W. J. HALL, and H. BUNYEA. A stained antigen for the rapid whole blood test for pullorum disease. J Am Vet Med Assoc (1931) 79:236-240.

18. SHIVAPRASAD, H. L. Pullorum disease and fowl typhoid. In: Diseases of poultry, 11th ed. Y. M. Saif, ed. Iowa State Press, Ames, Iowa. pp. 568-582. 2003.

19. WIGLEY P, HULME S, ROTHWELL L, BUMSTEAD N, KAISER P, BARROW P. Macrophages isolated from chickens genetically resistant or susceptible to systemic salmonellosis show magnitudinal and temporal differential expression of cytokines and chemokines following Salmonella enterica challenge. Infect Immun (2006) 74:1425-30. doi:10.1128/IAI.74.2.1425-1430.

20. WIGLEY P (2014) Salmonella enterica in the chicken: how it has helped our understanding of immunology in a non-biomedical model species. Front. Immunol. 5:482. doi: 10.3389/fimmu.2014.00482.

10. Miopatia em frangos de corte

bigstockphoto.com

Roselene Ecco[1] *- CRMV-MG 8324*
Juliana Fortes Vilarinho Braga[2]
[1] *Professora associada, médica veterinária, mestra e doutora, DCCV, Escola de Veterinária, UFMG*
[2] *Doutoranda, médica veterinária, mestra, DCCV, Escola de Veterinária, UFMG*

Introdução

A ocorrência de miopatia em frangos de corte tornou-se mais frequente nos últimos anos, refletindo diretamente em perdas econômicas para o setor produtivo[15,17]. A miopatia peitoral profunda, também conhecida como doença do músculo verde ou miopatia degenerativa do *supracoroideus*, é limitada ao músculo peitoral menor. A miopatia das estriações brancas envolve o músculo peitoral maior e os músculos das pernas e coxas[5,17]. A miopatia do músculo grande dorsal, em alguns frangos, foi observada conjuntamente com a miopatia peitoral profunda[21]. Estima-se que a miopatia das estriações brancas atinja, aproximadamente, 12% de incidência[3,15]. A miopatia peitoral profunda foi descrita pela primeira vez em perus e matrizes pesadas em 1968. Entretanto, ao longo dos anos, tornou-se

A miopatia em frangos possui diferentes apresentações: miopatia peitoral profunda, miopatia das estriações brancas e a miopatia do músculo grande dorsal (latissimus dorsi).

mais comum em frangos de corte[2], especialmente em frangos selecionados geneticamente para desenvolvimento dos músculos peitorais[19]. Alguns autores descrevem ainda uma terceira forma de miopatia peitoral, chamada de músculos pálidos, macios e exsudativos (do inglês *Pale, soft and exudative* – PSE), similar à condição descrita em suínos[1].

A miopatia das estriações brancas acomete o músculo peitoral maior e os músculos das coxas. Nessa condição, as lesões são caracterizadas por graus agudos a crônicos de necrose das fibras em paralelo e substituição por fibrose e/ou tecido adiposo.

Como descrito acima, a miopatia pode envolver o músculo peitoral maior (*m. pectoralis major*) e/ou o músculo peitoral menor (*m. pectoralis minor = supracoroideous muscle*). Os músculos peitorais são responsáveis pelo voo das aves e atuam sinergicamente, levantando e abaixando as asas[5]. O músculo peitoral maior é o principal músculo propulsor, sendo constituído por miofibras de contração rápida (tipo II B) com atividade glicolítica. Essas fibras respondem com rápido aumento da massa muscular branca quando recebem dietas com valores nutricionais elevados[16].

Etiologia e patogênese

A patogênese da miopatia peitoral ainda não foi totalmente esclarecida. No entanto, evidências apontam para a seleção genética, a qual determinou rápido crescimento e ganho de peso pelo aumento de tamanho dos músculos peitorais[6]. Com o aumento da massa muscular, o músculo peitoral menor, confinado entre a fáscia muscular inelástica e o esterno, sofre compressão, isquemia e, consequentemente, necrose. Acredita-se, ainda, que a movimentação das asas exerça maior efeito sobre o músculo peitoral menor, o qual sofre as alterações fisiológicas relacionadas ao exercício, como o aumento de volume, contribuindo para que ocorra a necrose. Além disso, o aumento da massa muscular da asa irá torná-la mais pesada, contribuindo ainda mais para a tensão sobre o músculo peitoral menor[2,5]. A miopatia peitoral profunda foi reproduzida em frangos de corte por meio de exercício forçado, em que as aves foram induzidas a bater as asas[13,18]. Nesse caso, apesar de ser uma lesão induzida por exercício, sua origem é isquêmica, em consequência da pressão exercida sobre a musculatura, a qual impede a perfusão sanguínea de forma adequada[6].

A miopatia das estriações brancas acomete o músculo peitoral maior e os músculos das coxas. Nessa condição, as lesões são caracterizadas por graus agudos a crônicos de necrose das fibras em paralelo e substituição por fibrose

e/ou tecido adiposo[9]. Aparentemente, as fibras mais susceptíveis são as fibras brancas. A seleção genética pode ter aumentado a quantidade de fibras brancas ou glicolíticas, as quais podem ser mais vulneráveis pelo aumento na demanda de energia e produção de lactato[14]. Paralelamente, a quantidade e a distribuição dos vasos e, consequentemente, o suprimento sanguíneo para o músculo diminuíram em proporção a densidade de fibras musculares, determinando hipóxia e remoção mais lenta do ácido láctico com consequente necrose[4].

Alguns autores descreveram a miopatia do músculo grande dorsal em frangos de corte machos de linhagens com crescimento rápido e com maior ganho de peso (com incidência de 6%)[21]. Vários desses frangos apresentaram miopatia do músculo dorsal concomitantemente à miopatia peitoral profunda. O músculo grande dorsal auxilia no movimento das asas dirigindo o movimento do úmero na contração dos músculos peitorais. As modificações fisiológicas que ocorrem no músculo durante a movimentação das asas poderiam determinar alterações na perfusão sanguínea e no pH, levando à necrose[21].

A miopatia peitoral sugerida como PSE ocorre no período pré-abate (um a três dias) e tem sido relacionada com o estresse antes da morte, que levaria à queda rápida no pH tecidual e à alta proporção de glicólise após a morte. Especula-se, também, a relação com a homeostase de cálcio sarcoplasmático livre influenciando a atividade enzimática da enzima fosfolipase A2 e consequente dano às membranas da fibra muscular[14].

Aparentemente, todas as linhagens de rápido crescimento são acometidas pela miopatia do músculo peitoral profundo. A faixa etária de maior ocorrência variou de 37 a 45 dias de idade nas linhagens Ross 308 e Cobb 500, respectivamente[7].

Nas fases iniciais ou agudas, observam-se áreas hemorrágicas e edemaciadas, intercaladas por áreas vermelho-pálidas. Em seguida, a musculatura torna-se esverdeada a acinzentada, com focos contendo material necrótico amorfo, desfazendo-se facilmente. Com a evolução da lesão, a musculatura torna-se esbranquiçada, firme e diminuída de volume.

Alterações macroscópias e histológicas

As lesões observadas incluem alterações na cor e na textura muscular. Na miopatia do músculo peitoral profundo, as lesões podem envolver quase a totalidade do músculo. Nas fases iniciais ou agudas, observam-se áreas hemorrágicas e edemaciadas, intercaladas por áreas vermelho-pálidas

(Fig. 1A). Em seguida, a musculatura torna-se esverdeada a acinzentada, com focos contendo material necrótico amorfo, desfazendo-se facilmente (Fig. 1B). Com a evolução da lesão, a musculatura torna-se esbranquiçada, firme e diminuída de volume (Fig. 1C)[5,6]. A cor verde possivelmente origina-se após a transformação da mioglobina (proteína liberada pelas fibras musculares após lesão) sob condições de anaerobiose. As áreas esbranquiçadas e firmes indicam fibroplasia pós-necrótica[5].

Na miopatia das estriações brancas, os músculos mais acometidos são o músculo peitoral maior e os músculos da coxa e da perna. As lesões são caracterizadas por estriações brancas e delgadas, entremeadas em paralelo por fibras musculares com a coloração normal (Fig. 2A)[9]. Na fase aguda, podem ser observados material gelatinoso amarelado no tecido subcutâneo e áreas de hemorragia na superfície do músculo alterado As áreas brancas tornam-se firmes com a evolução da lesão e indicam fibroplasia pós-necrótica[17].

A miopatia do músculo grande dorsal caracteriza-se por edema amarelado do tecido subcutâneo sobrejacente ao músculo. O músculo apresenta-se com equimoses na superfície, difusamente esbranquiçado (Fig, 2B), edemaciado e com a consistência diminuída[21].

Histologicamente, as lesões agudas para todas as apresentações de miopa-

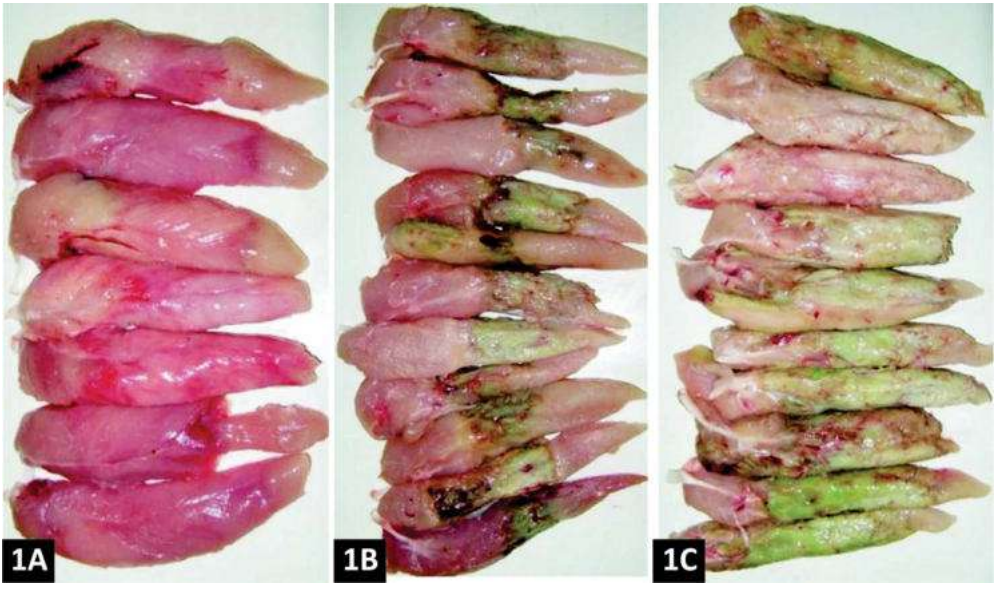


Figura 1. A. Vários músculos peitorais profundos aumentados de volume, edemaciados e com áreas de hemorragia caracterizando a fase aguda da miopatia. B e C. Vários músculos peitorais profundos com áreas de hemorragia entremeadas por áreas esverdeadas e amorfas e alguns esbranquiçados, caracterizando a fase crônica da miopatia. Fonte: Kijowski et al. (2009).

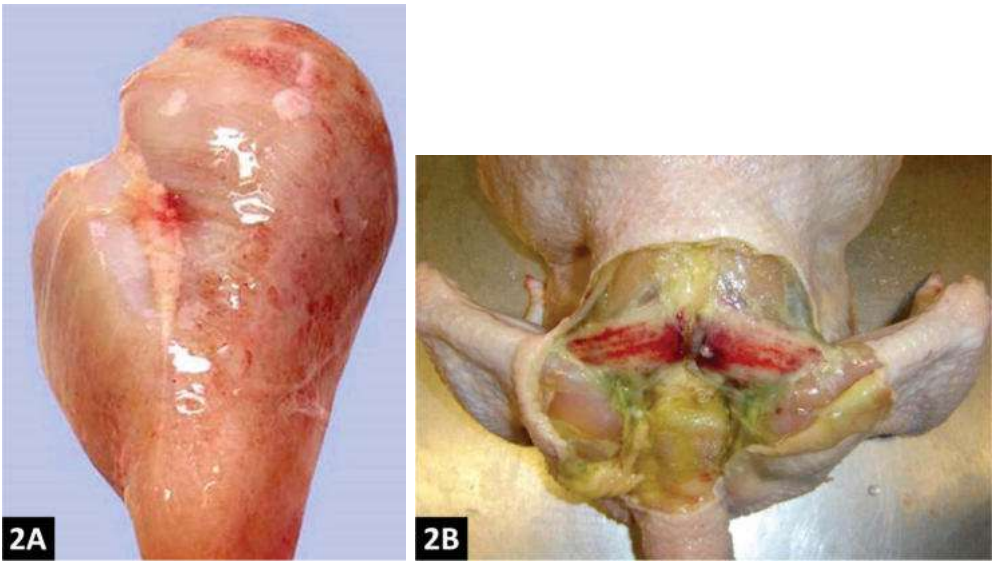


Figura 2. Frango de corte. A. Músculo peitoral maior caracterizando a miopatia necrosante das estriações brancas. Fonte: Sihvo et al. 2014. B. O músculo grande dorsal está esbranquiçado e com hemorragias, caracterizando a miopatia. Fonte: Zimermann, F. Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária – CDPA/ UFRGS.

tia são caracterizadas por degeneração e necrose de coagulação (Fig. 3A) associadas a infiltrado leve a moderado de macrófagos. Os vasos sanguíneos podem apresentar necrose da parede e trombose oclusiva. Em frangos com lesões de evolução mais prolongada, há necrose flocular com fragmentação de fibras envoltas por numerosos macrófagos. Além disso, proliferação de tecido conjuntivo fibroso moderada a acentuada também é observada. Alterações indicativas de regeneração muscular (miotubos) (Fig. 3B) são encontradas especialmente nas lesões crônicas. Na miopatia do músculo peitoral profundo, pode ocorrer também mineralização multifocal e infiltrado linfocitário multifocal predominantemente perivascular. A fáscia (epimísio) sobre o músculo peitoral maior apresenta-se espessa devido à proliferação intensa de colágeno. As células inflamatórias associadas a essa condição devem ser interpretadas como uma reação à necrose, especialmente os macrófagos, os quais estão atuando na fagocitose e retirada dos restos celulares necróticos[20].

Na fase aguda da miopatia das estriações brancas, há feixes de fibras com necrose de coagulação entremeados por feixes de fibras musculares normais. Na fase crônica, as fibras necróticas são reabsorvidas por macrófagos e substituídas por tecido conjuntivo fibroso e adiposo. Células inflamatórias constituídas por poucos heterófilos e linfócitos em agregados perivasculares multifocais também podem ser observadas[17]. Lesões si-

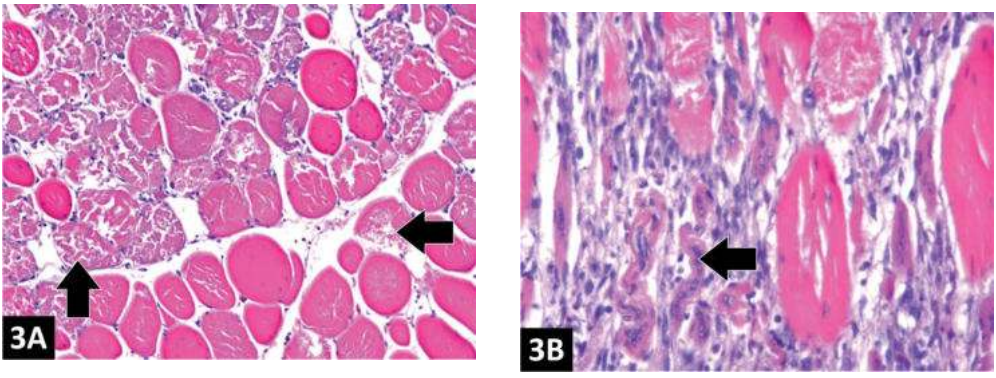


Figura 3. Frango de corte com 43 dias de idade. A. Músculo peitoral menor. Degeneração e necrose de coagulação (seta) multifocal, caracterizando a miopatia necrosante aguda. HE. 20x. B. Músculo peitoral menor. Miopatia com perda de fibras associada a infiltrado por macrófagos, fibroplasia e regeneração muscular (miotubos) (seta), caracterizando a fase crônica da miopatia. HE 40x.

milares foram descritas para a miopatia do músculo grande dorsal[21].

A coloração por Goodpasture (Gram histológico) de casos de miopatia não demonstrou bactérias associadas às lesões. Além disso, pela análise histopatológica, não há evidências de causas infecciosas para essa condição.

Diagnóstico e controle

A identificação da miopatia peitoral profunda é realizada inicialmente pelo exame macroscópico dos músculos peitorais menores, uma vez que a doença pode ocorrer uni ou bilateralmente[6]. São observadas alterações na coloração e na consistência dos músculos acometidos.[17] Amostras de tecido muscular com alterações macroscópicas devem ser coletadas, seccionando-se de preferência diferentes locais e tipos de músculos para permitir analisar estágios diferentes das lesões. As amostras, respeitando-se a espessura e a quantidade adequada do fixador (nove partes de solução para uma de amostra), devem ser coletadas e conservadas em formol tamponado neutro 10%. A análise histopatológica auxilia a estabelecer o diagnóstico da miopatia e a elaborar o diagnóstico diferencial com outras alterações musculares.

As amostras, respeitando-se a espessura e a quantidade adequada do fixador (nove partes de solução para uma de amostra), devem ser coletadas e conservadas em formol tamponado neutro 10%.

Para o diagnóstico diferencial das lesões musculares em frangos, devem-se considerar principalmente as seguintes causas: deficiência de vitamina E e de selênio e intoxicação por antibióticos ionóforos, como a monensina. Na intoxicação por ionóforos, as lesões possuem distribuição mais am-

pla entre os diferentes músculos e não ocorre fibrose e infiltrado linfocitário perivascular, como descrito para as miopatias isquêmicas[17].

A vitamina E é solúvel em lipídeos e atua prevenindo a distribuição de radicais livres, mantendo a integridade dos órgãos por evitar danos ao DNA e às proteínas das células. A vitamina E atua em sinergia com o selênio. A deficiência dessa vitamina causa encefalomalácia em pintinhos e, em frangos jovens, causa necrose de fibras dos músculos peitorais e das pernas, além do músculo da moela. As lesões macroscópicas e histológicas da miopatia nutricional são semelhantes às descritas para a miopatia das estriações brancas, no entanto essa condição ocorre especialmente em frangos com idade próxima ao abate. A utilização de diferentes níveis de vitamina E não mostrou diferenças na ocorrência da miopatia das estriações brancas[10]. A vitamina E parece não ter relação com a miopatia das estriações brancas que ocorre em frangos na fase final de crescimento[8,10]. Entretanto, a incidência da miopatia das estriações brancas foi comparativamente maior em frangos com maior volume muscular e peso (especialmente nos músculos peitorais)[8,12,15].

Tecido adiposo entre as fibras musculares pode ser observado em frangos sem lesão muscular e associado a dietas altamente calóricas. A suspeita da ocorrência de miopatia com estriações brancas deve acontecer quando as linhas brancas estão combinadas com edema e múltiplos focos de hemorragia (fase aguda) ou quando as linhas brancas estão mais firmes palpação ou ao corte (fase crônica reparativa).

Para o controle, deve-se limitar a movimentação e a atividade excessiva dos frangos após os 35 dias de idade. A movimentação excessiva pode ser influenciada por: a) fornecimento de ração e água; b) circulação excessiva de pessoas ou animais no galpão ou ao redor; c) uso de equipamentos com sonoridade alta; d) pesagem; e e) recolhimento ou captura de aves.

Considerações finais

A aparência macroscópica da musculatura influencia diretamente o consumidor da carne. Os músculos com estriações brancas apresentam um aspecto que, para o consumidor, significa carne com alto teor de gordura, fazendo com que este rejeite o produto[11].

O aumento na ocorrência de miopatia em frangos de corte aparentemente possui relação com o rápido desenvol-

O aumento na ocorrência de miopatia em frangos de corte aparentemente possui relação com o rápido desenvolvimento da massa muscular, bem como com a restrição na vascularização e a consequente oxigenação tecidual.

vimento da massa muscular, bem como com a restrição na vascularização e a consequente oxigenação tecidual. Não há evidências sólidas que permitam associação dessa condição com causas infecciosas. Estudos com seleção genética visando ao desenvolvimento adequado da massa muscular e a estruturas associadas como fáscias e vascularização devem ser intensificados para se evitarem maiores perdas econômicas. A relação dieta *versus* rápido crescimento e ganho de massa muscular também deve ser avaliada quando o lote é acometido pela miopatia peitoral.

Referências

1. BARBUT, S.; SOSNICKI, A.A.; LONERGAN, S.M.; KNAPP, T.; CIOBANU, D.C.; GATCLIFFE, L.J.; HUFF-LONERGAN, E.; WILSON, E.W. Progress in reducing the pale, soft and exudative (PSE) problem in pork and poultry meat. *Meat Science*, v.79, p.46-63, 2008.

2. BIANCHI, M.; PETRACCI, M.; FRANCHINI, A.; CAVANI, C. The occurrence of deep pectoral myophaty in roaster chickens. *Poultry Science*, v.85, p.1843-1846, 2006.

3. FERREIRA, T.Z.; CASAGRANDE, R.A.; VIEIRA, S.L.; DRIEMEIER, D.; KINDLEI, L. An investigation of a reported case of white striping in broilers. *Journal of Applied Poultry Research*, v.23, p.1-6, 2014.

4. HOVING-BOLINK, A.H.; KRANEN, R.W.; KLONT, R.E.; GERRITSEN, C.L.M.; DE GREEF, K.H. Fibre area and capillary supply in broiler breast muscle in relation to productivity and ascites. *Meat Science*, v.56, p.397-402, 2000.

5. KIJOWSKI, J.; KONSTANCZAK, M. Deep pectoral myophathy in broiler chickens. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, v.53, p.487-491, 2009.

6. KIJOWSKI, J.; KUPINSKA, E. Induction of DPM changes in broiler chickens and characteristics of myophathy symptons. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, v.56, p.217-223, 2012.

7. KIJOWSKI, J.; KUPINSKA, E.; KACZMAREK, A.; STANGIERSKY, J.; POPIOL, A. Occurence and characteristics of chicken breast muscles with DPM symptoms. *Medycyna Weterynaryjna*, v.65, p.466-471, 2009.

8. KUTTAPPAN, V.A.; BREWER, V.B.; MAUROMOUSTAKOS, A.; MCKEE, S.R.; EMMERT, J.L.; MEULLENET, J.F.; OWENS, C.M. Estimation of factors associated with the occurrence of white striping in broiler breast fillets. *Poultry Science*, v.92, p.811-819, 2013b.

9. KUTTAPPAN, V.A.; SHIVAPRASAD, H.L.; SHAW, D.P.; VALENTINE, B.A.; HARGIS, B.M.; CLARK, F.D.; MCKEE, S.R.; OWENS, C.M. Pathological changes associated with white striping in broiler breast muscles. *Poultry Science*, v.92, p.331-338, 2013a.

10. KUTTAPPAN, V.A.; GOODGAME, S.D.; BRADLEY, C.D.; MAUROMOUSTAKOS, A.; HARGIS, B.M.; WALDROUP, P.W.; OWENS, C.M. Effect of different levels of dietary vitamin E (DL-α-tocopherol acetate) on the occurrence of various degrees of white striping on broiler breast fillets. *Poultry Science*, v.91, p.3230-3235, 2012a.

11. KUTTAPPAN, V.A.; LEE, Y.S.; ERF, G.F.; MEULLENET, F.C.; MCKEE, S.R.; OWENS, C.M. Consumer acceptance of visual appearance of broiler breast meat with varying degrees of white striping. *Poultry Science*, v.91, p.1240-1247, 2012b.

12. KUTTAPPAN, V.A.; BREWER, V. B.; CLARK,

F.D.; MCKEE, S.R.; MEULLENET, J.F.; EMMERT, J.L.; OWENS, C.M. Effect of white striping on the histological and meat quality characteristics of broiler fillets. *Poultry Science*, 88 (Suppl. 1), 447p. (Abstr.), 2009.

13. LIEN, R.J.; BILGILI, S.F.; HESS, J.B.; JOINER, K.S. Induction of deep pectoral myopathy in broiler chickens via encouraged wing flapping. *Journal of Applied Poultry Research*, ***v.***21, p.556-562, 2012.

14. MITCHELL, M.A.; SANDERCOCK, D.A. Spontaneous and stress induced myopathies in modern meat birds: A cause for quality and welfare concerns. Proceedings of Australian Poultry Science Symposium, v.16, p.100-107, 2004.

15. PETRACCI, M.; MUDALAL, S.; BONFIGLIO, A.; CAVANI, C. Occurrence of white striping under commercial conditions and its impact on breast meat quality in broiler chickens. *Poultry Science, v.*92, p.1670-1675, 2014.

16. ROY, B.C.; OSHIMA, I.; MIYACHI, H.; SHIBA, N.; NISHIMURA, S.; TABATA, S.; IWAMOTO, H. Effects of nutritional level on muscle development, histochemical properties of myofibre and collagen architecture in the *pectoralis* muscle of male broilers. *British Poultry Science*, v.17, p.433-442, 2006.

17. SIHVO, H.-K.; IMMONEN, K.; PUOLANNE, E. Myodegenetarion with fibrosis and regeneration in the pectorais major muscle of broilers. *Veterinary Pathology*, v.51, p.619-623, 2014.

18. SILLER, W.G.; MARTINDALE, L.; WIGHT, P.A.L. The prevention of experimental deep pectoral myopathy of the fowl by fasciotomy. *Avian Pathology*, v.8, p.301-307, 1979.

19. SILLER, W.G. Deep pectoral myopathy: A penalty of successful selection for muscle growth. *Poultry Science*, v.64, p.1591-1595, 1985.

20. WIGHT, P.A.L.; SILLER, W.G. Pathology of deep pectoral myophaty of broilers. *Veterinary Pathology*, v.17, p.29-39, 1980.

21. ZIMERMANN, F.C.; FALLAVENA, L.C.B.; SALLE, C.T.P.; MORAES, H.L.S.; SONCINI, R.A.; BARRETA, M.H.E.; NASCIMENTO, V.P. Downgrading of heavy broiler chicken carcasses due to myodegeneration of the anterior *latissimus dorsi*: pathologic and epidemiologic studies. *Avian diseases*, v.56, p.418-421, 2012.

11. Colibacilose em aves comerciais

bigstockphoto.com

Juliana Fortes Vilarinho Braga[1]
Roselene Ecco[2] *- CRMV-MG 8324*
Nelson Rodrigo da Silva Martins[3] *- CRMV-MG 4809*
[1] *Doutoranda, médica veterinária, mestre, Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias, UFMG*
[2] *Professora associada, médica veterinária, mestra e doutora, Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias, UFMG*
[3] *Professor associado, médico veterinário, mestre e doutor, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Escola de Veterinária, UFMG.*

Introdução

A colibacilose é uma doença de grande relevância econômica na avicultura mundial por ser uma das principais causas de queda na produtividade, custos com tratamento e condenação de carcaças de aves[15,17]. O termo "colibacilose" refere-se a qualquer infecção localizada ou sistêmica causada por *Escherichia coli* patogênica aviária (*Avian Pathogenic* Escherichia coli, *APEC*)[5].

APEC são estirpes de *E. coli* que possuem características de virulência específicas com capacidade de causar doença[13]. Estão presentes na microbiota do intestino e em outras mucosas de aves domésticas e silvestres, o que faz com que sorotipos patogênicos e não patogênicos possam ser isolados a partir do ambiente avícola[32].

Em aves comerciais, APEC estão associadas, na maioria das vezes, a infecções extraintestinais (principalmente do trato respiratório ou infecções sistêmicas) e resultam em uma variedade de doenças[23]. Embora as APEC sejam consideradas patógenos primários ou secundários, em aves, a maioria das doenças produzidas por esses patógenos são secundárias a condições predisponentes relacionadas ao ambiente e/ou ao hos-

pedeiro. Assim, o controle de tais condições pode reduzir significativamente as perdas devido às doenças causadas por APEC[13].

Epidemiologia

Como mencionado anteriormente, APEC são habitantes normais do aparelho digestório de muitas espécies de aves e estão presentes em grandes quantidades no conteúdo intestinal e nas excretas[27]. O intestino das aves é colonizado por *E. coli* patogênica e não patogênica nas primeiras horas após a eclosão, com rápida multiplicação da bactéria no órgão[23]. A bactéria também coloniza o trato respiratório superior (faringe e traqueia) e pode ainda ser isolada de pele e penas, dependendo do nível de contaminação ambiental[27]. Por essa razão, APEC e *E. coli* não patogênica podem ser isoladas de aves sadias a partir desses locais. Essa informação tem grande relevância, pois evidencia que *apenas* o isolamento da bactéria *não* é suficiente para diagnosticar a colibacilose, como será discutido (tópico "Diagnóstico").

A contaminação vertical por APEC se dá pela transmissão da bactéria das reprodutoras para a progênie e pode ocorrer durante a incubação, por meio da contaminação da casca, ou *in ovo*, como consequência de salpingite[23]. A transmissão horizontal da bactéria ocorre pelo contato com outras aves ou por meio de fezes, água e alimentos contaminados. Frequentemente, as aves são contaminadas por inalação de poeira, que pode conter grande quantidade de APEC. Já foi demonstrado que o risco de ocorrência da colibacilose aumenta com a elevação do nível de contaminação ambiental[7]. O período de incubação varia de 12 a 72 horas. A taxa de morbidade varia, e a mortalidade é de, aproximadamente, 5 a 20%, com pico de mortalidade ocorrendo cinco dias após o início da doença[49].

A incidência da doença aumenta diante de qualquer fator que possa lesionar o epitélio respiratório das aves[13]. Lesões no trato respiratório podem ocorrer devido a altas temperaturas, ventilação deficiente, elevadas concentrações de amônia no ambiente e presença de micotoxinas na ração[13]. Além de problemas relacionados ao manejo, infecções bacterianas (*Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*, *Pasteurella multocida* e *Avibacterium paragallinarum*) ou virais (Metapneumovírus aviário, vírus da bronquite infecciosa das galinhas, vírus da doença de Marek e vírus da doença de Newcastle) podem predispor as aves à infecção por APEC[5,11]. É interessante ressaltar que mesmo vacinas com vírus vivo podem favorecer a APEC devido à lesão transitória que elas podem produzir durante a replicação viral necessária à indução da imunidade[21].

Etiologia

E. coli é uma bactéria Gram-negativa, não álcool-ácido resistente, não for-

madora de esporos, de forma e tamanho variáveis, geralmente com 2-3 x 0,6µm. É habitante do trato intestinal de todos os mamíferos e aves, com várias diferentes estirpes, e muitas são espécie-específica, sendo a maioria móvel com flagelo peritríquio. Podem ser cultivadas aerobicamente e anaerobicamente em meios nutrientes comuns. à temperatura de 18 a 44ºC. Em placas de ágar sangue incubadas a 37ºC por 24 horas, produz colônias pequenas, convexas, lisas e incolores. Em relação às características bioquímicas, produzem ácido e gás em testes de fermentação de glicose, maltose, manitol, glicerol, ramnose, sorbitol e arabnose. Produzem indol e são positivas para vermelho de metila e negativas para reação de Voges-Proskauer e fermentam a glicose[5,6,20,39].

Possuem três tipos de antígenos: 'O' (somático), 'H' (flagelar) e 'K' (capsular). O antígeno 'O' é uma endotoxina termoestável liberada durante a lise da bactéria[37] e é responsável por 60% dos casos de colibacilose[17]. Além disso, é um dos principais antígenos usados para classificação de *E. coli*[37], sendo frequentemente utilizado para tipificação sorológica[11]. Cinquenta por cento dos isolados de APEC pertencem aos sorogrupos O1, O2, O5, O8, O18 e O78[45]. O antígeno 'K' está associado com virulência[37] e, assim como o antígeno 'H', é termolábel. A bactéria é moderadamente resistente ao ambiente, mas é susceptível a desinfetante e temperatura de 80ºC[30].

Patogênese

A patogênese e o papel dos fatores de virulência envolvidos na colibacilose ainda não foram completamente elucidados, embora progresso considerável tenha sido alcançado nos últimos anos para se estabelecerem os mecanismos da patogênese[32]. Ao contrário de outros grupos patogênicos de *E. coli*, não há uma característica única ou um conjunto de características que definam os patotipos de APEC[15]. Ainda falta uma definição clara de seus patotipos com relação aos sorogrupos, genes de virulência específicos ou ensaios de virulência específicos[13,18]. Embora diversos sorogrupos tenham sido isolados de aves septicêmicas, os sorogrupos O1:K1, O2:K1 e O78:K80 ainda são reconhecidos como os mais prevalentes. Entretanto, o número de sorogrupos publicados está aumentando. Isolados pertencentes ao mesmo grupo 'O' podem ser geneticamente diversos, enquanto estirpes estreitamente relacionadas podem refletir diferentes sorogrupos[1,8].

As estirpes de *E. coli* que causam doença extraintestinal de qualquer espécie compartilham características comuns e são denominadas *E. coli* patogênica extraintestinal (Extraintestinal pathogenic *E. coli*, ExPEC). A maioria das APEC são ExPEC e compartilham características com os ExPEC de mamíferos[5].

Na patogênese de ExPEC, a bactéria tem acesso aos tecidos do hospedeiro diretamente, através de lesões de pele, ou após colonização da mucosa. Essa é dependente de fatores de adesão que permitem a ligação do microrganismo a receptores específicos e, posteriormente, sua multiplicação. As estirpes virulentas são capazes de atravessar a mucosa, especialmente se esta tiver sido previamente lesionada, e sobreviver no ambiente extracelular[5]. Entretanto, o ambiente extramucosa é extremamente hostil à bactéria e, caso esta não possua fatores que capacitem sua sobrevivência (p. ex., fatores de virulência), será rapidamente destruída por células fagocíticas, como heterófilos, trombócitos e macrófagos[25,26]. A bactéria é fagocitada por macrófagos localizados no baço e no fígado e tem acesso à circulação[4]. A fagocitose e a destruição do microrganismo são promovidas por opsoninas, como complemento e anticorpos contra o antígeno 'O' (endotoxinas), proteínas de membrana externa e fímbrias[2,3]. As endotoxinas podem ajudar na sobrevivência e disseminação de APEC, uma vez que diminuem a habilidade bactericida dos macrófagos pulmonares[16].

Imediatamente após a exposição de APEC ou suas endotoxinas aos tecidos das aves, há uma resposta inflamatória aguda. Proteínas de fase aguda produzidas no fígado e citocinas IL-1, IL-6 e TNF aumentam rapidamente, as quais podem servir como indicadores não específicos do início da doença [9,41,55]. Os efeitos da fase aguda de endotoxemia incluem diminuição do consumo de ração e eficiência alimentar, diminuição do peso corporal e do peito, entre outros. Além disso, há acúmulo de líquido e proteína nos tecidos e, posteriormente, nas cavidades corporais, devido ao aumento da permeabilidade vascular. A liberação de fatores quimiotáticos para heterófilos faz com que estes migrem para os tecidos circundantes[35]. Entre seis e 12 horas, exsudato gelatinoso torna-se visível macroscopicamente e, após esse período, ocorre a substituição progressiva do infiltrado inflamatório de heterófilos para macrófagos e linfócitos. O exsudato continua a se acumular e, eventualmente, torna-se caseoso, sendo caracterizado por material firme, pastoso a seco, amarelado e irregular. Microscopicamente, o exsudato caseoso é constituído por heterófilos e macrófagos contendo quantidade variável de colônias bacterianas intralesionais e circundado por células gigantes multinucleadas[10]. O tecido lesionado pode se regenerar se o dano não for muito grave, mas geralmente há algum grau de fibrose, que pode ser completa se a destruição tecidual for extensa. O exsudato contendo fibrina pode organizar-se e tornar-se tecido cicatricial (fibrose).

As lesões macroscópicas estão inversamente relacionadas à patogenicidade. Estirpes altamente patogênicas causam mortalidade tão rapidamente

que as lesões macroscópicas têm pouco tempo para se desenvolverem, enquanto aves infectadas com estirpes menos patogênicas sobrevivem mais tempo e desenvolvem lesões mais extensas[5]. As aves sobreviventes ao quadro de septicemia podem apresentar algumas lesões menos frequentes, como salpingite (infecção do oviduto), meningoencefalite, celulite, osteomielite e sinovite, esplenomegalia, fígado esverdeado e hiperemia do tecido muscular[21].

Em relação às APEC causadoras de doença intestinal, os mecanismos pelos quais a bactéria causa infecção não foram totalmente elucidados[15]. Uma vez que as estirpes APEC aderem à borda apical do epitélio intestinal, produzem toxinas, também conhecidas como enterotoxinas, levando à ativação de adenilato ciclase (no caso de toxina termolábel) e guanilato ciclase (em caso de toxinas termoestáveis). Essa ativação resulta na maior produção de cAMP e cGMP, que afeta a absorção de sódio, cloreto e o balanço hídrico, levando à diarreia aquosa, e a morte ocorre por desidratação e choque hipovolêmico[15].

Síndromes clínicas

A infecção pode se manifestar como uma septicemia inicial, que é seguida por morte súbita ou inflamação localizada em múltiplos órgãos, dependendo da virulência da estirpe, da imunidade do hospedeiro, da presença e dos tipos de fatores predisponentes. As lesões mais comumente associadas com colibacilose são peri-hepatite, aerossaculite e pericardite, embora outras síndromes, como osteoartrite/sinovite, peritonite da gema, salpingite, coligranuloma, onfalite e celulite, possam ocorrer[5].

Doença respiratória crônica complicada e colisepticemia

É a doença infecciosa mais comum de aves comerciais. A doença respiratória crônica (DRC) ocorre com maior frequência em aves entre quatro e nove semanas de idade e comumente progride para septicemia. Essa síndrome clínica geralmente depende da associação com outros agentes ou fatores que produzem lesão prévia do epitélio do trato respiratório superior (tópico "Epidemiologia"), como perda de cílios e acúmulo de muco, os quais favorecem a colonização e a multiplicação de APEC. Após entrada pelo trato respiratório superior, colonização e multiplicação da bactéria na traqueia, há disseminação para os sacos aéreos e os tecidos adjacentes. As principais lesões observadas são peri-hepatite (Fig. 1A), aerossaculite (Fig. 1B) e pericardite (Fig. 1C), as quais compõem a "tríade de condenação de carcaça" (Fig. 1A), frequentemente encontradas no abatedouro e associadas à infecção por *Mycoplasma gallisepticum*. As aves acometidas podem apresentar pneumonia, pleuropnemonia e peritonite, podendo evoluir para septicemia e morte[21].

A pericardite e a peri-hepatite são condições também encontradas na colisepticemia. Tais condições ocorrem como uma sequela de septicemia, e a APEC se estabelece no fígado e no coração. No coração, observa-se espessamento do saco pericárdico, que se apresenta opaco e preenchido por líquido esbranquiçado ou amarelado. Na superfície do fígado, pode-se observar a deposição de uma membrana de fibrina espessa, que se destaca facilmente[5].

Coligranuloma

Coligranuloma é uma doença relativamente incomum, uma forma rara de colibacilose, e pode causar mortalidade de até 75% em lotes individuais. É uma doença de aves adultas, caracterizada por granulomas nodulares, geralmente do tamanho de grãos de milho, semelhante ao observado na tuberculose. Os nódulos são encontrados no fígado, na moela, no duodeno, no ceco, no pulmão, nos rins, no mesentério e na parede intestinal. Não são observados nódulos no baço. As lesões macroscópicas incluem hiperemia de vísceras, necrose de coagulação e aumento de volume do fígado, granulomas nodulares no mesentério e na parede intestinal (particularmente ceco), hiperemia e aumento de volume do baço e atrofia de bursa de Fabricius. Os nervos periféricos e a medula óssea encontram-se normais[19,46].

Infecção do saco da gema

Também conhecida como doença do sono, é responsável por altos índices de mortalidade precoce de pintinhos. A doença ocorre pela infecção por APEC no umbigo e no saco da gema de pintinhos recém-eclodidos, como consequência de contaminação antes que haja a cicatrização do umbigo. Infecção neonatal de pintinhos pode ocorrer horizontalmente, durante ou logo após a incubação a partir do ambiente, ou verticalmente, por meio da galinha. Podem ser observadas retenção do saco da gema, onfalite, septicemia e mortalidade de pintinhos jovens até a terceira semana de idade. Após a eclosão, os pintinhos apresentam andar cambaleante e aparentam sonolência, relutância para movimentar-se e tendem a permanecer sob a fonte de calor. Apresentam-se apáticos, com perda de apetite, abdômen aumentado de volume, respiração ruidosa e diarreia. As lesões macroscópicas incluem saco da gema aumentado e hiperêmico; a gema que era viscosa e espessa adquire coloração amarelo-esverdeada, aquosa ou viscosa, exalando odor desagradável[47,49]. Em seguida, as aves morrem, sendo o pico de mortalidade nos dois primeiros dias de vida do pintinho. Os pintinhos que sobrevivem aos primeiros dias dificilmente serão tão saudáveis ou fortes como os demais do lote[38].

Septicemia aguda

Ocorre em aves em crescimento e adultas, sendo descrita principalmente em frangos de corte. É a forma mais prevalente de colibacilose, caracterizada por polisserosite e levando à depressão e à febre, frequentemente, com alta mortalidade. As possíveis rotas de infecção são: infecção neonatal, infecção por lesões de pele, infecção de órgãos reprodutivos, do trato respiratório e via oral. As estirpes APEC alcançam a circulação sanguínea e atingem o coração, fígado, baço e outras visceras. No fígado, observam-se hepatomegalia com pequenos focos esbranquiçados ou difusamente esverdeados, esplenomegalia, hiperemia pulmonar, hiperemia dos músculos peitorais e tendência para pericardite e peritonite. A infecção do miocárdio causa falha cardíaca. Aves morrem de forma aguda, e, à necropsia, a carcaça pode estar em boa condição corporal e com papo cheio. A septicemia, ocasionalmente, também leva sinovite e à osteomielite e, raramente, à panoftalmite[5,43].

Peritonite

Ocorre em poedeiras e matrizes por ovulação ectópica. Nessa condição, observa-se fibrina e gema livre na cavidade celomática e ocorre mortalidade de forma aguda. A bactéria entra no oviduto e cresce no conteúdo da gema na cavidade celomática, levando ao acúmulo de material fibrinoso ou viscoso amarelado (semelhante a exsudato purulento)[33].

Panoftalmite

É uma consequência incomum da septicemia por APEC. Nessa condição, pode ocorrer cegueira devido a hipópio e hifema. Os olhos apresentam-se aumentados de volume, com aparência embaçada a opaca e hiperemia inicial. A presença de exsudato fibrino-heterofílico e colônias bacterianas é característica. A inflamação pode tornar-se granulomatosa gradualmente. A bactéria pode persistir no olho acometido por muito tempo, levando ao descolamento e à atrofia de retina e à ruptura da lente. A maioria das aves morre pouco tempo depois do início das lesões, mas algumas podem se recuperar. À histopatologia, são observadas áreas necróticas circundadas por infiltrado de heterófilos e células gigantes multinucleadas[5,40].

Osteoartrite e sinovite

São infecções da articulação com (osteoartrite) ou sem (artrite, Fig. 1E) envolvimento ósseo e/ou sinóvia e ocorre como sequela da colisepticemia, podendo ser experimentalmente produzida por inoculação intravenosa de APEC. Muitas aves recuperam-se dentro de uma semana após infecção, mas outras podem tornar-se cronicamente infectadas e emaciadas[5,14].

Salpingite

É a inflamação do oviduto e ocorre principalmente em galinhas de postura, resultando em diminuição na produção de ovos e mortalidade esporádica. A doença pode apresentar curso agudo ou crônico, resultante de infecção ascendente a partir da cloaca ou de infecção do saco aéreo abdominal[33,42]. As aves acometidas não produzem ou põem ovos. Na salpingite crônica, o oviduto apresenta conteúdo amarelo-acinzentado e pode conter grandes massas caseosas. Na histopatologia, a reação tecidual do oviduto é leve, consistindo principalmente de infiltração de heterófilos multifocal a difusa subjacente ao epitélio. Em poedeiras, a salpingite pode levar à peritonite se houver deposição de material da gema na cavidade abdominal. Esta é caracterizada por inflamação serofibrinosa dos tecidos circundantes. É importante ressaltar que uma ave com ooforite ou salpingite causada por APEC pode infectar o conteúdo interno do ovo antes de a formação da casca se completar[28,51].

Dermatite necrótica (celulite)

Frangos de corte podem ser acometidos por dermatite necrótica, também conhecida como celulite, caracterizada por inflamação crônica do subcutâneo na região abdominal e nas coxas[31].

Síndrome da cabeça inchada

É a inflamação dos tecidos subcutâneos (celulite) periorbitais e adjacentes na cabeça, ocorrendo principalmente em frangos de corte. As aves afetadas apresentam descarga ocular e conjuntivite, que progridem para aumento de volume periorbital. Finalmente, os olhos ficam fechados e o aumento de volume da cabeça torna-se uma alteração marcante nas aves severamente afetadas. Na fase aguda, as aves podem apresentar também hiperemia traqueal e pulmonar. As lesões microscópicas incluem inflamação fibrino-heterofílica e granulomas heterofílicos nos espaços aéreos dos ossos cranianos, na orelha média e nos ossos faciais, além de conjuntivite e traqueíte linfoplasmocitária. Pneumovírus aviário e vírus da rinotraqueíte dos perus, juntamente com *E. coli*, estão associados à síndrome da cabeça inchada, sendo esta considerada uma doença causada geralmente por infecção oportunista por *E. coli*. A síndrome pode causar redução de 2 a 3% na produção de ovos e mortalidade de 3 a 4% [24,52].

Diarreia em pintinhos

Acomete pintinhos na primeira semana de vida e é causada por APEC com capacidade de aderir e obliterar o epitélio do trato intestinal (em inglês, é conhecida como *Attaching and Effacing Escherichia coli, AEEC*). Os pintinhos infectados por AEEC podem estar clini-

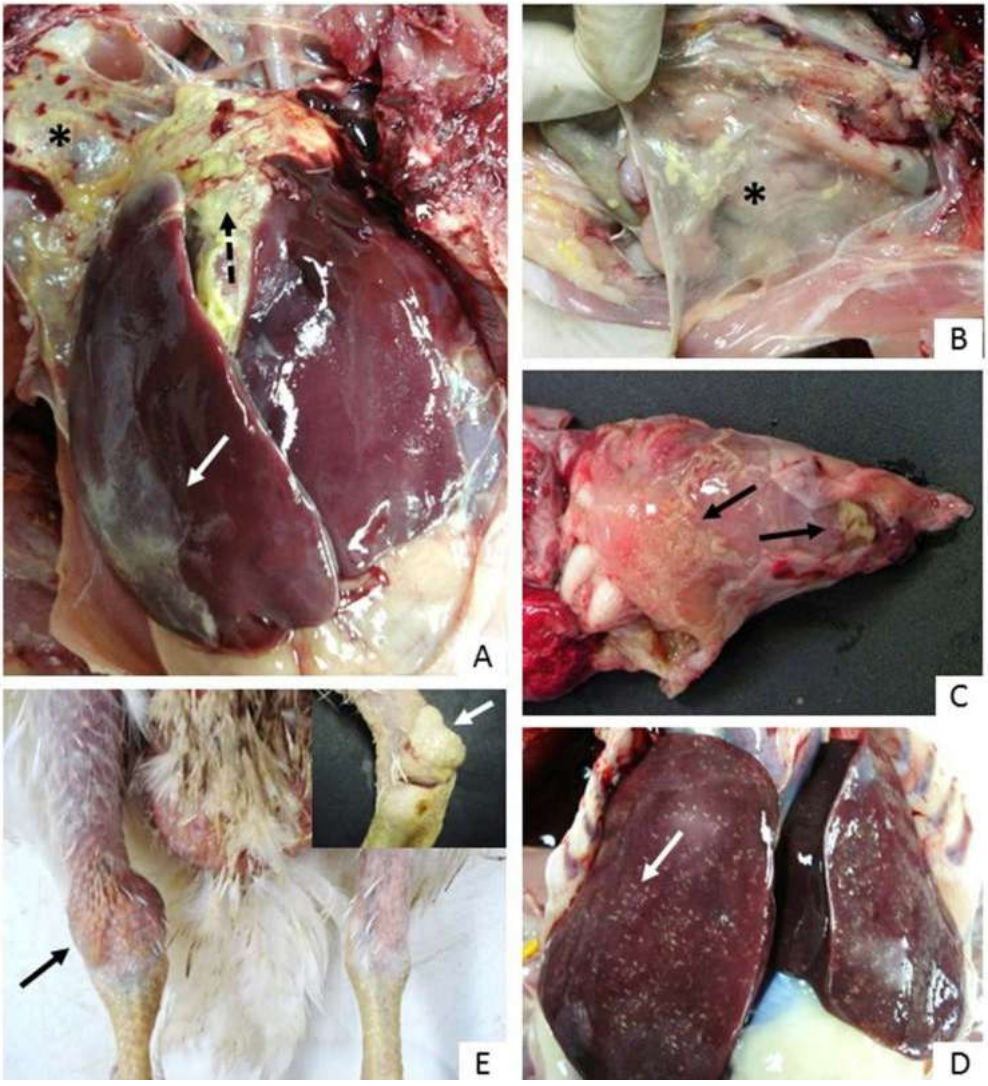


Figura 1. Frango de corte. Cavidade celomática: peri-hepatite ( ) fibrinosa, pericardite ( ) e aerossaculite (*) fibrinocaseosas que compõem a "tríade de condenação de carcaça"; (B) saco aéreo torácico posterior: aerossaculite caseosa caracterizada por espessamento e opacidade do saco aéreo e deposição de exsudato caseoso (*); (C) coração e saco pericárdico: pericardite fibrinosa ( ); (D) fígado: hepatite necrótica multifocal ( ); (E) articulação tibiotarso-metatársica direita: artrite acaracterizada por intensa quantidade de exsudato viscoso amarelado. Observar o aumento de volume da articulação acometida ( ) em relação a seu antímero e o aspecto do exsudato ( ), ao corte (quadrante superior direito da figura 'E'.

camente normais ou apresentar diarreia e desidratação. Nas aves clinicamente acometidas, os intestinos podem estar pálidos e distendidos, com fluido, contendo ou não muco ou exsudato. Geralmente os cecos são os segmentos do intestino mais afetados e apesentam-se distendidos, com conteúdo líquido marrom e gás[5]. O diagnóstico da doença é feito por exame histopatológico, pois as alterações produzidas pela bactéria podem ser visualizadas apenas ao microscópio e concentram-se nos cecos. A histopatologia dessa porção do intestino revela grande quantidade de cocobacilos aderidos aos enterócitos, obliterando os microvilos das células. Além disso, as células epiteliais superficiais apresentam-se de formato irregular, degeneradas ou necróticas, frequentemente com erosão. A borda em escova não se apresenta nitidamente definida nos enterócitos apicais onde as bactérias estão aderidas e pode-se observar perda de microvilos na superfície dos enterócitos em que há numerosas bactérias[50].

Diagnóstico

A suspeita da doença em aves é baseada nas características clínicas e na presença de lesões macroscópicas típicas. Material caseoso na cavidade abdominal, pericardite, peri-hepatite fibrinosa, aerossaculite, salpingite e peritonite de ovulação ectópica são sugestivos de infecção por APEC. O diagnóstico pode ser feito pelo isolamento e pela identificação de *E. coli* a partir das lesões. É importante ressaltar que apenas o isolamento da bactéria não é suficiente para o diagnóstico da doença. Esse é válido apenas quando há detecção do agente associado às lesões observadas nas aves.

Para isolamento de APEC, devem ser realizadas culturas de sangue cardíaco e tecidos acometidos, como fígado, baço, sacos aéreos, gema, saco da gema, exsudato do saco pericárdico ou cavidade celomática e medula óssea. Deve-se evitar contaminação com conteúdo intestinal. A coleta de amostra para isolamento bacteriano pode ser realizada utilizando-se suabes ou alças de inoculação estéreis, os quais podem ser introduzidos no parênquima hepático após este ter sua superfície flambada com espátula aquecida[34]. Experimentalmente, foi demonstrado que, em casos agudos, o isolamento é possível a partir de seis horas até três dias após a infecção; em casos subagudos, o isolamento é possível até sete dias após a infecção[22]. Contaminação com conteúdo intestinal é raramente um problema, quando se utilizam material fresco e métodos bacteriológicos padronizados. Meios seletivos, como MacConkey, eosina azul de metileno ou ágar lactose Drigalski, podem ser utilizados para isolamento. Identificação das colônias isoladas é baseada em reações bioquímicas, previamente citadas no tópico "Etiologia"[13].

Teste de patogenicidade dos isolados de *E. coli* também são essenciais

para determinar a virulência do isolado[12]. Até o presente momento, todos os fatores de virulência detectados de *E. coli* isolados de aves com colibacilose também têm sido identificados em isolados de amostras fecais de aves clinicamente saudáveis. Por essa razão, nenhum deles pode ser utilizado para identificação de APEC[29]. É interessante ressaltar que, embora a sorotipagem ainda seja o método de diagnóstico mais utilizado em laboratórios, ela permite apenas a identificação de um número limitado de estirpes de APEC. Tem sido relatado que o ELISA é mais sensível do que o teste de hemaglutinação indireta, que é comumente utilizado para detecção de anticorpos contra *E. coli*. Estudos recentes sugerem que a sorotipagem não deveria ser utilizada como ferramenta de diagnóstico efetiva, particularmente pelo fato de que o sorotipo não reflete a virulência de APEC. Alguns métodos de diagnósticos têm sido desenvolvidos para melhorar a identificação de APEC e baseiam-se na detecção de fatores de virulência. Recentemente, foi publicado um método de genotipagem que permite a identificação de mais isolados de APEC com maior confiabilidade do que os métodos de sorotipagem clássicos utilizados nos laboratórios veterinários[45].

As lesões observadas na colibacilose são semelhantes àquelas causadas por outros microrganismos, assim o diagnóstico diferencial para outros agentes deve ser realizado. A aerossaculite pode ser causada por *Mycoplasma* e *Chlamydophila*; pericardite pode também ser causada por *Chlamydophila*; e peri-hepatite pode também resultar de infecção por *Pasteurella*, *Salmonella* e outros microrganismos[5]. Além dessas, infecções causadas por outras bactérias, como *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Clostridium*, *Klebsiella* e *Proteus*, precisam ser diferenciadas[5,48,49]. Logo, quando houver lesões sugestivas de colibacilose, a etiologia necessita ser confirmada pelo isolamento da bactéria.

Prevenção, tratamento e controle

A doença pode ter sua incidência reduzida pelo controle da contaminação ambiental e por redução das condições que favoreçam infecções respiratórias predisponentes. O método mais direto seria reduzir e controlar a contaminação intestinal por sorogrupos patogênicos. Alguns pesquisadores observaram que sorotipos patogênicos poderiam ser excluídos do trato intestinal por exclusão competitiva quando pintinhos recém-eclodidos foram alimentandos com microbiota intestinal de aves resistentes[54]. Outros métodos preventivos incluem a redução da transmissão da bactéria por fumigação de ovos dentro de duas horas

após a postura, além do descarte de ovos com casca rachada ou com contaminação fecal evidente. Infecções do trato respiratório das aves podem ser reduzidas adquirindo-se aves livres de *Mycoplasma* e controlando-se o ambiente da granja (umidade, ventilação, concentração de amônia e poeira no ar)[13].

As vacinas contra *E. coli* são limitadas à proteção homóloga, enquanto as vacinas utilizadas contra os agentes primários que favorecem a colibacilose secundária podem atuar elas mesmas como agentes primários[53]. Melhoramento genético para seleção de aves com menor susceptibilidade à doença pode contribuir para sua prevenção, mas, para isso, metas de reprodução e critérios de seleção devem ser bem definidos. Estudos anteriores não fornecem informações suficientes sobre resposta clínica ou associações entre respostas para promover uma definição racional de susceptibilidade à doença. Isso, juntamente com melhorias gerais de alojamento, alimentação e ventilação, tem ajudado a reduzir a incidência da doença[32].

Tratamento com antibióticos e quimioterápicos é uma forma de diminuir o impacto da doença[21], entretanto o custo é alto e frequentemente não resulta em recuperação suficiente antes do abate[53]. É importante ressaltar que, após o isolamento e a identificação de *E. coli*, deve-se sempre realizar teste de sensibilidade antimicrobiana (antibiograma) para escolha do antibiótico para tratamento da doença, pois vem-se observando elevação da ocorrência de resistência aos medicamentos antimicrobianos, devido ao uso indiscriminado e prolongado, a concentrações subterapêuticas e a indicações ineficientes[21]. O sucesso do tratamento é maior quando feito na fase inicial da doença. Os fármacos mais frequentemente utilizados são quinolonas de terceira geração (enrofloxacina, danofloxacina), sulfa associada a trimetoprim, macrolideos (eritromicina, tilosina) e aminoglicosídeos (apramicina, gentamicina)[21].

Saúde pública

Além do impacto em saúde animal, tem sido considerada a hipótese de que um grupo de APEC pode apresentar um potencial risco zoonótico[15,19,44]. A hipótese de que aves comerciais possam atuar como fonte e reservatório de *E. coli* contendo genes de virulência e de resistência ou capacidade de causar doença transmitida por alimentos a humanos tem sido considerada[44]. Estudos que compararam APEC e *E. coli* isolada de diferentes amostras clínicas humanas sustentam essa hipótese, entretanto o potencial zoonótico de APEC ainda é questionável[36].

Referências

1. Achtman, M.; Pluschke, G. Clonal analysis of descent and virulence among selected *Escherichia coli*. *Ann Rev Microbiol*, v.40, p.185-210, 1986.

2. Arp, L. H. Effect of passive immunization on phagocytosis of blood-borne *Escherichia coli* in spleen and liver of turkeys. *Am J Vet Res*, v.43, p.1034-40, 1982.

3. Arp, L. H. Effects of antibodies to type 1 fimbriae on clearance of fimbriated *Escherichia coli* from the bloodstream of turkeys. *Am J Vet Res*, v.46, p.2644-7, 1985.

4. Arp, L. H.; Cheville, N. F. Interaction of bloodborne *Escherichia coli* with phagocytes of spleen and liver in turkeys. *Am J Vet Res*, v.42: p.650-7, 1981.

5. Barnes, H. J.; Nolan, L. K.; Vaillancourt, J-P. Colibacillosis. In.: Saif, Y. M. (ed), Diseases of poultry. Blackwell Publishing, Ames, IA, 2008. pp. 691-732.

6. Bettelheim, K.A. Biochemical characteristics of *Escherichia coli*. In.: Gyles, C.L. (Ed). *Escherichia coli* in domestic animals and humans. CAB Int'l, Wallingford, UK, 1994. p.3-30.

7. Carlson, H. C.; Whenham, G. R. Coliform bacteria in chicken broiler house dust and their possible relationship to coli-septicemia. *Avian Dis*, v.12, p.297-302, 1968.

8. Caugant, D. A.; Levin, B. R.; Orskov, I. et al. Genetic diversity in relation to serotype in *Escherichia coli*. *Infect Immun*, v.49, p.407-13, 1985.

9. Chamanza, R.; Veen, L.; Tivapasi, M.T. et al. Acute phase proteins in the domestic fowl. *World Poult Sci J*, v.55, p.61-71, 1999.

10. Cheville, N. F.; Arp, L. H. Comparative pathologic findings of *Escherichia coli* infections in birds. *J Am Vet Med Assoc*, v.173, p.584-7, 1978.

11. Dhama, K.; Chakraborty, S.; Barathidasan, R. et al. *Escherichia coli*, an economically important avian pathogen, its disease manifestations, diagnosis and control, and public health significance: A review. *Res Opin Anim Vet Sci*, v.3, p.179-94, 2013.

12. Dhama, K.; Mahendran, M. Technologies and advances in diagnosis and control of poultry diseases: safeguarding poultry health and productivity. *Poult Technol*, v.2, p.13-6, 2008.

13. Dho-Moulin, M.; Fairbrother, J. M. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Vet Res*, v.30, p.299-316, 1999.

14. Droual, R.; Chin, R. P.; Rezvani, M. Synovitis, osteomyelitis, and green liver in turkeys associated with *Escherichia coli*. *Avian Dis*, v.40, p.417-24, 1996.

15. Dziva, F.; Stevens, M. P. Colibacillosis in poultry: unravelling the molecular basis of virulence of avian pathogenic Escherichia coli in their natural hosts. *Avian Pathol*, v.37, p.355-66, 2008.

16. Emery, D. A.; Nagaraja, K. V.; Sivanandan, V. et al. Endotoxin lipopolysaccharide from *Escherichia coli* and its effects on the phagocytic function of systemic and pulmonary macrophages in turkeys. *Avian Dis*, v.35, p.901-9, 1991.

17. Ewers, C.; Janssen, T.; Kiessling, S. et al. Molecular epidemiology of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from colisepticemia in poultry. *Vet Microbiol*, v.104, p.91-101, 2004.

18. Ewers, C.; Janssen, T.; Wieler, L. H. Aviare pathogene *Escherichia coli* (APEC). *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, v.116, p.381-95, 2003.

19. Ewers, C.; Li, G.; Wilking, H. et al. Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing Escherichia coli: how closely related are they? *Intern J Med Microbiol*, v.297, p.163-76, 2007.

20. Ewing, W. H. Edwards and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae. 4 th ed. Elsevier, Amsterdam, 1986. pp: 1-536.

21. Ferreira, A. J. P.; Knöbl, T. Colibacilose Aviária. In.: Berchieri Júnior, A.; Silva, E. N.; Di Fabio, J.; Sesti, L.; Zuanaze, M. A. F. (eds). Doenças das Aves. Campinas: FACTA, 2009. pp.457-71.

22. Gomis, S. M.; Watts, T.; Riddell, C. et al. Experimental reproduction of *Escherichia coli* cellulitis and septicemia in broiler chickens. *Avian Dis*, v.41, p.234-40, 1997.

23. Gross, W. B. Diseases due to *Escherichia coli* in poultry. In.: Gyles, C. L. (ed.). *Escherichia coli* in Domestic Animals and Humans. CAB International Library: Wallingford, UK, 1994. pp: 237-60.

24. Gross, W. B. Factors affecting the development of respiratory disease complex in chickens. *Avian Dis*, v.34, p.607-10, 1990.

25. Harmon, B. G. Avian heterophils in inflammation and disease resistence. *Poult Sci*, v.77, p.972-7, 1998.

26. Harmon, B. G.; Glisson, J. R. *In vivo* microbicidal activity of avian peritoneal macrophages. *Avian Dis*, v.33, p.177-81, 1989.

27. Harry, E. G.; Hemsley, L. A. The relationship between environment contamination with septicemia strains of *Escherichia coli* and their incidence in chickens. *Vet Rec*, v.77, p.241-45, 1965.

28. Jordan, F. T.; Williams, N. J.; Wattret, A. et al. Observations on salpingitis, peritonitis and salpingoperitonitis in a layer breeder flock. *Vet Rec*, v.157, p.573-7, 2005.

29. Kabir, S. M. L. Avian colibacillosis and salmonellosis: A closer look at epidemiology, pathogenesis, diagnosis, control and public health concerns. *Intern J Environ Res Public Health*, v.7, p.89-114, 2010.

30. Khoo, L. L.; Hasnah, Y.; Rosnah, Y. et al. The prevalence of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) in peninsular Malaysia. Malays J Vet Res, v.1, p.27-31, 2010.

31. Kumor, L. W.; Olkowski, A. A.; Gomis, S. M. et al. Cellulitis in broiler chickens: epidemiological trends, meat hygiene, and possible human health implications. *Avian Dis*, v.42, p.285-91, 1998.

32. La Ragione, R. M.; Woodward, R. M. Virulence factors of *Escherichia coli* serotypes associated with avian colisepticemia. *Res Vet Sci*, v.73, p.27-35, 2002.

33. Landman, W. J.; Cornelissen, R. A. *Escherichia coli* salpingitis and peritonitis in layer chickens: an overview. *Tijdschrift voor Diergeneeskunde*, v.131, p.814-22, 2006.

34. Lee, M. D.; Nolan, L. K. Colibacillosis. In.: Dufour-Zavala, L.; Swayne, D. E.; Glisson, J. R. et al. (eds.) A Laboratory manual for the isolation, identification and characterization of avian pathogens, 5th ed. Am Assoc Avian Pathologists, Athens, GA, 2008. pp.10-11.

35. Madhu, S.; Katiyar, A. K.; Vegad, J. L. et al. Bacteria-induced increased vascular permeability in the chicken skin. *Indian J An Sci*, v.71, p.621-22, 2001.

36. Maluta, R. P.; Logue, C. M.; Casas, M. R. T. et al. Overlapped Sequence Types (STs) and Serogroups of Avian Pathogenic (APEC) and Human Extra-Intestinal Pathogenic (ExPEC) *Escherichia coli* Isolated in Brazil. *Plos one*, v.9, p.1-11, 2014.

37. Mellata, M.; Dho-Moulin, M.; Dozois, C. M. et al. Role of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence factors in bacterial interaction with chicken heterophils and macrophages. *Infec Immun*, v.71, p.494-503, 2003.

38. Montgomery, R. D.; Boyle, C. R.; Lenarduzzi, T. A. et al. Consequences to chicks hatched from *Escherichia coli* inoculated embryos. *Avian Dis*, v.43, p.553-63, 1999.

39. Montgomery, R. D.; Jones, L. S.; Boyle, C. R. et al. The embryo lethality of *Escherichia coli* isolates and its relationship to various *in vitro* attributes. *Avian Dis*, v.49, p.63-9, 2005.

40. Nakamura, K.; Abe, F. Ocular lesions in chickens inoculated with *Escherichia coli*. *Can J Vet Res*, v.51, p.528-30, 1987.

41. Nakamura, K.; Mitarai, Y.; Yoshioka, M. et al. Serum levels of interleukin-6, alpha1-acid glycoprotein, and corticosterone in two-week-old chickens inoculated with *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Poult Sci*, v.77, p.908-11, 1998.

42. Ozaki, H.; Murase, T. Multiple routes of entry for *Escherichia coli* causing colibacillosis in commercial layer chickens. *J Vet Med Sci*, v.71, p.1685-9, 2009.

43. Pourbakhsh, S. A.; Boulianne, M.; Martineau Doize, B. et al. Dynamics of *Escherichia coli* infection in experimentally inoculated chickens. *Avian Dis*, v.41, p.221-33, 1997.

44. Rodriguez-Siek, K. E.; Giddings, C. W.; Doetkott, C. et al. Comparison of *Escherichia coli* isolates implicated in human urinary tract

infection and avian colibacillosis. *Microbiol*, v.151, p.2097-2110, 2005.

45. Schouler, C.; Schaeffer, B.; Brée, A. et al. Diagnostic Strategy for Identifying Avian Pathogenic *Escherichia coli* Based on Four Patterns of Virulence Genes. *J Clin Microbiol*, v.50, p.1673-8, 2012.

46. Shah, K. A.; Qureshi, S. Clinical study on Hjarre's disease in poultry. *Vetscan*, v.1, n.2, art.7, 2006.

47. Shah, M. S. D.; Khan, S. A.; Aslam, A. et al. Effect of experimental yolk sac infection with *E. coli* on immune status of broiler chicks. *Pakist Vet J*, v.24, p.125-8, 2004.

48. Shane, S. M. Multifactorial conditions. In.: Shane, S. M. (ed.). Handbook on Poultry Diseases. 2 ed. 2005. pp: 91-110.

49. Singh, S. D.; Tiwari, R.; Dhama, K. Avian collibacillosis, an economically important disease of young chicks. *Poultry World*, p: 14-20, 2011.

50. Sueyoshi, M.; Nakazawa, M. Experimental Infection of Young Chicks with Attaching and Effacing *Escherichia coli*. *Infect Immun*, v.62, p.4066-71, 1994.

51. Timothy, S.; Shafi, K.; Leatherbarrow, A. H. et al. Molecular epidemiology of a reproductive tract-associated colibacillosis outbreak in a layer breeder flock associated with atypical avian pathogenic *Escherichia coli*. *Avian Pathol*, v.37, p.375-8, 2008.

52. Van de Zande, S.; Nauwynck, H.; Pensaert, M. The clinical, pathological and microbiological outcome of an *Escherichia coli* O2:K1 infection in avian pneumovirus infected turkeys. *Vet Microbiol*, v.81, p.353-65, 2001.

53. Vandemaele, F.; Vereecken, M.; Derijcke, J. et al. Incidence and antibiotic resistance of pathogenic *Escherichia coli* among poultry in Belgium. *Vet Rec*, v.151, p.355-56, 2002.

54. Weinack, O. M.; Snoeyenbos, G. H.; Smyser, C. F. et al. Competitive exclusion of intestinal colonization of *Escherichia coli* in chicks. *Avian Dis*, v.25, p.696-705, 1981.

55. Xie, H.; Newberry, L.; Clark, F.D. et al. Changes in serum ovotransferrin levels in chickens with experimentally induced inflammation and diseases. *Avian Dis*, v.46, p.122-131, 2002.