

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Escola de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

Willian Henrique de Magalhães Santos

**INFLUÊNCIA DAS VACINAS RECOMBINANTES VETORIZADAS NO
CONTROLE DA LARINGOTRAQUEÍTE INFECCIOSA EM GALINHAS DE
POSTURA DE UMA ÁREA COM ALTA DENSIDADE POPULACIONAL**

Belo Horizonte
2019

Willian Henrique de Magalhães Santos

**INFLUÊNCIA DAS VACINAS RECOMBINANTES VETORIZADAS NO
CONTROLE DA LARINGOTRAQUEÍTE INFECCIOSA EM GALINHAS DE
POSTURA DE UMA ÁREA COM ALTA DENSIDADE POPULACIONAL**

Programa de Pós-Graduação em Ciência da
Informação da Universidade Federal de Minas
Gerais como requisito parcial para obtenção do
título de Mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Roselene Ecco

S237i Santos, Willian Henrique de Magalhães, 1991.
Influência das vacinas recombinantes vetorizadas no controle da Laringotraqueíte infecciosa em galinhas de postura de uma área com alta densidade populacional / Willian Henrique de Magalhães Santos – 2019.

86p.: il.

Orientadora: Roselene Ecco

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciência da Informação da Universidade Federal de Minas Gerais.

1- Galinhas - Doenças – Teses - 2- Laringe – Doenças – Teses – 3 – Traquéia- Doenças - Teses
4- Histopatologia veterinária – Teses – I - Ecco, Roselene – II – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária – III – Título.

CDD – 636.50896

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes – CRB2569

FOLHA DE APROVAÇÃO

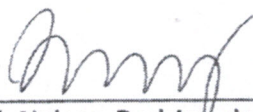
WILLIAN HENRIQUE DE MAGALHÃES SANTOS

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração PATOLOGIA ANIMAL.

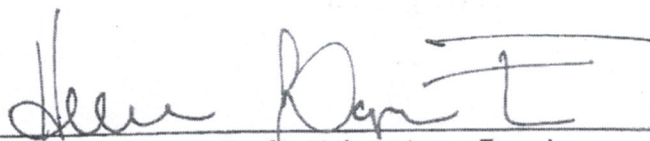
Aprovada em 27 de Fevereiro de 2019, pela banca constituída pelos membros:



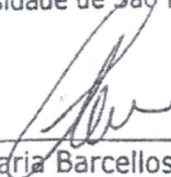
Prof^a. Roselene Ecco
Presidente - Orientador



Prof. Nelson Rodrigo da Silva Martins
Escola de Veterinária - UFMG



Prof^a. Helena Lage Ferreira
Universidade de São Paulo - USP



Prof^a. Christiane Maria Barcellos Magalhães da Rocha
Universidade Federal de Lavras - UFLA

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Geraldo e Andréa, agradeço pelo amor, dedicação e por me apoiarem incondicionalmente em todas as minhas escolhas. Vocês sempre serão meus maiores exemplos. Agradeço aos dois pelo apoio e pelo incentivo e a oportunidade a me dedicar ao que sempre amei. Ao meu irmão, Gabriel, pela amizade e o carinho de sua presença.

À Escola de Veterinária da UFMG, por ter me acolhido desde a graduação e por permitir a concretização desse sonho. À banca examinadora, pelas sugestões e críticas. À FAPEMIG e CAPES pelo apoio financeiro do projeto, ao CNPq pela concessão da bolsa e ao IMA e aos veterinários Luiz A. Torino e Simone G. Palma, pela ajuda na realização do projeto.

A Izabella Hergot, ao professor Nelson Martins, a professora Christiane Rocha e aos alunos de iniciação científica Camila, Aline, Nathália muito obrigado pela enorme ajuda nas coletas e processamentos das amostras. Ao professor Maurício Resende pela confecção dos reagentes.

A todos as profissionais do setor de patologia, aos técnicos, residentes, pós-graduandos e alunos de iniciação científica, muito obrigada por toda ajuda, pelas conversas e momentos de descontração.

A minha orientadora Roselene Ecco agradeço pelos ensinamentos desde a graduação e pela oportunidade de ter sido seu orientado. Muito obrigado pela valiosa ajuda na realização desse trabalho. Agradeço imensamente a paciência durante todos esses anos e sou grato principalmente pela confiança depositada em mim e pela credibilidade que tive como aluno e como médico veterinário.

Aos meus queridos amigos do Ecco Team, Ágna, Letícia, Luís, Maria, Matheus e Philipe, pela ajuda indispensável nos dias de experimento e de coleta, sempre com um sorriso no rosto e com uma ótima conversa para qualquer momento, além dos ótimos momentos de descontração e perrengues que passamos juntos. Ao Prof Raphael pelo auxílio com a análise estatística.

A todos meus queridos amigos e familiares, que sempre me incentivam a ir mais longe. Aos meus amigos de infância e irmãos da vida, Aline, Bia, Fernanda, Juliana, Mateus, Paulo, Samella, Livia Rossi e a minha prima Livia por todos estes anos de amizade e mesmo com a

distância estão sempre presentes e dispostos a tornarem os meus dias mais leves, mais engraçados e com mais amor.

Aos meus amigos do “Nós em Minas” essa família que criei em BH e que foi de extrema ajuda nesta jornada pela veterinária, tanto nos bons quanto nos maus momentos e principalmente nos desabafos. Amizades que começaram em 2010/1 e que espero que durem para toda a vida e com vários gourmetizando nesse meio tempo. Ao “Setor de RH” pela exclusividade e aos ótimos momentos de descontração e viagens!

RESUMO

A laringotraqueíte infecciosa (LTI) é uma doença viral respiratória altamente contagiosa, que acomete galinhas e frangos de todas as idades. No ano de 2010, foi descrito um surto de LTI em Minas Gerais, envolvendo 27 granjas de postura e interdição da movimentação de aves da região. A agência governamental de saúde avícola autorizou e implementou a utilização de vacinas recombinantes vetorizadas HVT-LT e FPV-LT para o controle da LTI na região. Entre os anos de 2014 a 2018, avaliou-se em condições de campo a influência destas vacinas no controle da LTI utilizando diferentes protocolos vacinais. Este é o primeiro estudo de campo com longa duração avaliando a eficácia do uso de vacinas recombinantes vetorizadas em uma região com alta densidade de aves com múltiplas idades. Foram examinadas amostras de 1.284 aves, provenientes de coletas programadas (vigilância ativa) e das coletas por notificação (vigilância passiva). Novecentas e vinte e três aves (vigilância ativa) foram analisadas pela PCR da traqueia (TQ) e dos gânglios dos nervos trigêmeos (GTs). Em 278 (28,86%) aves detectou-se DNA do VLTI na TQ, GTs ou ambos. Nestas mesmas aves, foi realizada a histopatologia dos tecidos respiratórios e conjuntiva. Em seis (0,66%) aves foram encontradas lesões consistentes com LTI e em duas aves obteve-se resultado positivo para o VLTI por PCR da TQ. Trezentas e onze (311/963) aves foram avaliadas por ELISA. Em 173 (55,6%) aves, títulos variáveis de anticorpos anti- VLTI foram detectados. Destas 311 aves, uma foi positiva na avaliação histopatológica, PCR da TQ e sorologia, 41 foram positivas tanto na sorologia quanto na PCR, com ausência de lesões histológicas, e 185 foram positivas por ELISA ou PCR na ausência de lesões histológicas. Oitenta e quatro aves foram negativas em todos os testes. Das 321 aves amostradas por vigilância passiva, 124 (38,62%) apresentaram lesões histológicas compatíveis ou consistentes com LTI. Quando avaliados estatisticamente os resultados dos exames de PCR, a proporção de aves positivas e negativas foi diferente entre os anos ($p < 0,0001$). Diferença estatística foi também constatada na proporção de aves positivas e negativas entre diferentes granjas ($p = 0,001$). Não houve diferença estatística na proporção total de aves positivas e negativas quando comparados os diferentes protocolos de vacinação. No entanto, a análise dentro de granjas mostrou diferença estatística ($p = 0,04$), havendo menor proporção de positividade (5%) para aves que receberam vacinação dupla. A proporção de infecção nas aves de diferentes linhagens foi significativamente diferente ($p = 0,0049$), sendo a Hyline, a linhagem com maior proporção de aves infectadas (34,74%). Em relação a sazonalidade, no inverno ocorreu maior proporção de aves infectadas ($p = 0,041$). As categorias

de idades das aves não estão associadas com a infecção pelo VLTI ($p=0,2050$). A análise filogenética em cinco amostras realizando sequenciamento parcial dos genes ICP4 e TK possibilitaram classificar estirpes virulentas do VLTI. Quatro amostras foram agrupadas juntamente com as amostras de 2011 e separadamente com uma amostra de 2018, na qual foram identificados três nucleotídeos com polimorfismo. Todas as amostras foram geneticamente próximas mas diferentes das estirpes de São Paulo. O surgimento de uma nova estirpe na região sugere evolução do vírus, possivelmente com maior patogenicidade, aumentando o desafio para o controle para o controle da doença. Contudo, os resultados desse estudo indicaram que as vacinas recombinantes vetorizadas podem influenciar na diminuição da porcentagem de aves positivas para o VLTI, diminuindo a ocorrência de surtos, porém não impedem a infecção latente.

Palavras chave: *Gallid herpesvirus 1*, laringotraqueíte, galinhas de postura, vacinas vetorizadas, histopatologia, PCR, sequenciamento.

ABSTRACT

Infectious laryngotracheitis (ILT) is a highly contagious respiratory viral disease that affects chickens and broilers of all ages. In 2010, there was an outbreak of ILT in Minas Gerais, affecting 27 layers poultry farm with the prohibition of chicken transportation out of the region. The governmental poultry health agency authorized and implemented the use of recombinant HVT-LT and FPV-LT vector vaccines for the control of ILT in the region. Between 2014 and 2018, the influence of different recombinant vector vaccine protocols was evaluated under field conditions in the control of ILT. This is the first long-term field study of the efficacy of ILT vectored vaccines in a high-density multiple age layer hens region. Samples of 1,284 chickens from the scheduled samplings (active surveillance) and those collected by notification (passive surveillance). Ninety sixty-three chickens (active surveillance) were analyzed by PCR of trachea (TQ) and trigeminal ganglia (GT). In 278 (28.86%) chickens, viral DNA of ILTV was detected in the TQ, GT or both. Histopathology of the respiratory and conjunctival tissues was performed in 902 chickens and six (0.66%) showed lesions consistent with ILT and two were also positive by PCR of TQ. Three hundred and eleven (311/963) chickens were evaluated by ELISA. In 172 (55.3%) chickens, variable titers of anti-ILTV antibodies were detected. Of these 311 birds, one was positive in the histopathological evaluation, PCR of TQ and serology, 41 were positive in both serology and PCR, with no histological lesions and 185 were positive by ELISA or PCR in the absence of histological lesions. Eighty-four chickens were negative in all tests. Of the 321 chickens sampled by passive surveillance, 124 (38.62%) showed histological lesions of ILT. When the results of the PCR were statistically evaluated, the proportion of positive and negative individuals was different among the years ($p < 0.0001$). Statistical difference was also found in the proportion of positive and negative animals among different farms ($p = 0.001$). There was no statistical difference in the proportion of positive and negative chickens when different vaccination protocols were compared; however, the analysis within farms, showed significative difference ($p = 0.04$), with a lower proportion of positive chickens (5%) when double vaccinated. The proportion of infected chickens in different layer breeds was significantly different ($p = 0.0049$), where Hy-line breed had the highest proportion of infected birds (34.74%). In relation to seasonality, in winter there was a higher proportion of infected birds ($p = 0.41$). Age categories of chickens were not associated with ILTV infection ($p = 0.2050$). All sequences were classified as Brazilian virulent ILTV based on partial phylogenetic analysis of concatenated sequences from TK and ICP4 genes of the ILTV genome. Four samples were grouped together with 2011 Minas Gerais samples and separated with one sample of 2018, which had three single nucleotide polymorphism (SNP). The comparison of Minas Gerais strains and São Paulo strains revealed close genetic relatedness but with some differences. The emerging of a different genetic strain, possible with higher pathogenicity,

increases the challenge to control this disease. Therefore, the results of this study indicated that using dual vaccination with vectored recombinant vaccines could help to decrease the percentage of positive chickens for the VLTl, reducing clinical disease, although latency was not impeded.

Keywords: *Gallid herpesvirus 1*, laryngotracheitis, layer hens, vectored vaccine, histopathology, PCR, sequencing.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estados brasileiros com relatos de LTI ou com a caracterização do VLTI.....	21
Figura 2- Localização geográfica das granjas amostradas.....	33
Figura 3-Organograma de amostragem.	36
Figura 4 – Localização anatômica do nervo trigêmeo.....	37
Figura 5 - Achados clínicos e macroscópicos das aves amostradas durante a vigilância ativa.	46
Figura 6- Lesões em galinha poedeiras ativas com sinais clínicos respiratórios similares a LTI.....	47
Figura 7- Resultados da detecção (em porcentagem) do DNA do VLTI das aves em amostras de traqueia, de gânglios dos nervos trigêmeos ou em ambos de todas as aves examinadas por coleta.	51
Figura 8 – Dendograma baseado nas sequencias dos genes TK e ICP4 concatenados.....	54
Figura 9-Valores da titulação de anticorpos detectados em aves com diferentes idades.....	56
Figura 10- Fotomicroscopia da laringe de uma galinha com laringite fibrinonecrótica circunferencial acentuada.	58
Figura 11- Quadro de imagens: lesões micro e macroscópicas de galinhas de postura provenientes da vigilância passiva.....	58
Figura 12- Doenças diagnosticadas por histopatologia em aves provenientes da vigilância passiva nos anos de 2016 a 2018.....	59
Figura 13- Variação de temperatura diária referente as datas de amostragens (06/2014 – 02/2017) e ao surto ocorrido em junho de 2016.....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Características das vacinas mais utilizadas no controle da LTI.....	31
Tabela 2- Características das granjas amostradas com relação ao número de aves e estrutura física.....	34
Tabela 3- Escore da distribuição, tipo e intensidade da lesão histológica.....	40
Tabela 4- Resultados da avaliação histopatológica relacionando o período da coleta com o diagnóstico, o número de aves e o escore da lesão.....	48
Tabela 5- Amostras sequenciadas e tamanhas dos produtos obtidos.....	53
Tabela 6- Resultados dos valores sorológicos detectados em aves que receberam protocolos de vacinação diferentes.....	55
Tabela 7- Resultados em números absolutos e porcentagem de aves positivas em diferentes métodos de diagnóstico e com diferentes protocolos vacinais.....	56
Tabela 8- Número de aves examinadas e diagnóstico por ano pela vigilância passiva.....	57
Tabela 9- Número de aves examinadas, tipo de exame e porcentagem de aves com diagnóstico positivo para o VLTI e/ou LTI.	60

LISTA DE ABREVIATURAS

A - Adenina

C - Citosina

CEO - *Cell embryo origin*

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

ELISA - Ensaio de imunoabsorção enzimática

EV/UFGM - Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais

FP-LT - Vacina recombinante vetorizada para laringotraqueíte infecciosa tendo como vetor *Avipoxvirus fowlpox*

FPV - *Avipoxvirus fowlpox*

G – Guanina

GaHV-1 - *Gallid herpesvirus - 1*

GT - Gânglio trigêmeo

GTs - Gânglios dos nervos trigêmeos

HE - Coloração de hematoxilina e eosina

HSV - *Herpesvirus simplex tipo 1*

HVT - *Herpesvirus 1 dos perus*

HVT-LT – Vacina recombinante para laringotraqueíte infecciosa tendo como vetor *Herpesvirus 1 dos perus*

ICP4 - Proteína da célula infectada 4

INDEA-MT - Instituto de Defesa Agropecuária do Estado de Mato Grosso

INMET - Instituto Nacional de Meteorologia

LANAGRO - Laboratório Nacional Agropecuário

LTI - Laringotraqueíte infecciosa

VLTI- Vírus da laringotraqueíte infecciosa

NDV - Doença de Newcastle

OIE - *Office International des Epizooties - World Organization for animal health*

ORF - *Open reading frame*

PB – Pares de bases

PCR - Reação em cadeia da polimerase

SPF - *specific pathogen free*

T - Timina

TCO - *Tissue cell origin*

TK - Timidina quinase

TQ - Traqueia

UL - Região longa única

US - Região curta única

VLTI - Vírus da laringotraqueíte infecciosa aviária

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1.Histórico	19
2.2.LTI no Brasil.....	20
2.3.Etiologia.....	21
2.4.Epidemiologia.....	23
2.5.Infecção e patogênese	24
2.6.Patologia	25
2.7.Diagnóstico	26
2.8.Controle	28
2.9.Vacinas	30
3. OBJETIVOS.....	32
3.1.Objetivo geral	32
3.2.Objetivos específicos	32
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
4.1.Localização geográfica, caracterização das granjas	32
4.2.Amostragens por vigilância ativa	34
4.3.Dados meteorológicos	37
4.4.Coleta e processamento de amostras	37
4.5.Macroscopia e histopatologia	38
4.6.Amostragens por vigilância passiva	41
4.7.Reação em cadeia de polimerase (PCR).....	41
4.8.Sequenciamento	42
4.9.ELISA (Ensaio de imunoabsorção enzimática).....	43
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS.....	45

6. RESULTADOS.....	45
6.1.Sinais clínicos e macroscopia	45
6.2.Histopatologia.....	46
6.3.Resultados da PCR	49
6.3.1. Resultados da PCR para o VLTi por coleta	49
6.3.2. Resultados da PCR para o VLTi por granja	50
6.3.3. Resultados da PCR para o VLTi por estação	51
6.3.4. Resultados da PCR para o VLTi por vacinação	51
6.3.5. Resultados da PCR para o VLTi por linhagem	52
6.4.Resultados do sequenciamento dos genes ICP4 e TK	52
6.5.Resultados da sorologia (ELISA) para o VLTi	55
6.6.Resultados gerais referentes às análises sorológicas, PCR e por histopatologia das coletas por vigilância ativa em aves que receberam protocolos vacinais diferentes	56
6.7.Resultados das aves amostradas por vigilância passiva	57
6.8.Resultados proporcionais dos exames para detecção do VLTi e do exame histopatológico.....	59
6.9.Dados meteorológicos da região amostrada.....	60
7. DISCUSSÃO.....	62
8. CONCLUSÕES.....	69
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71
10. ANEXOS.....	81
10.1. Anexo 1 - Portaria Nº1107, de 30 de novembro de 2010.....	81
10.2. Anexo 2 – CEUA e prorrogação do CEUA	83
10.3. Anexo 3 – Termos de consentimento proprietário das granjas.....	84
10.4. Anexo 4 – Tabela: Resultados e linhagem das aves amostradas na vigilância ativa e positivas na PCR.	85

1. INTRODUÇÃO

A laringotraqueíte infecciosa (LTI) é uma doença viral respiratória altamente contagiosa, que acomete principalmente galinhas e frangos de todas as idades, geralmente observada a partir de três semanas de vida. Essa doença leva a grandes perdas econômicas devido às altas taxas de morbidade e mortalidade, também acarretando em diminuição da produção de ovos, perda de peso e predisposição a infecções respiratórias secundárias. Epizootias da forma grave da doença causam alta morbidade, geralmente entre 90% -100% e mortalidade variável entre 5%-70%, usualmente variando de 10%-20% (Hinshaw *et al.*, 1931; Jordan, 1966; Bagust e Guy, 1997). A LTI é causada pelo *Gallid herpesvirus 1* (GaHV-1), gênero *Iltovirus*, da subfamília *Alphaherpesvirinae*, membro da família *Herpesviridae* (Davison 2005 - *International Committee of Taxonomy of Viruses*, 2018). Galinhas são os hospedeiros primários deste vírus (Crawshaw e Boycott, 1982; Guy e Garcia, 2008; Portz *et al.*, 2008). O VLTI também infecta e causa doença em faisões, híbridos de galinhas, pavões (Crawshaw e Boycott, 1982; Hilbink, 1985; Guy e Garcia, 2008), perdizes (Guy e Garcia, 2008) e perus (Guy e Garcia, 2008; Portz *et al.*, 2008). O VLTI já foi isolado em galinhas d'angola (Bautista, 2003) e em patos com infecção subclínica e soroconversão (Yamada *et al.*, 1980). Algumas espécies de aves como estorninhos, pardais, corvos, pombos, patos (Guy e Garcia, 2008), canários, periquitos, galinha d'angola e codornas japonesas (Hilbink, 1985) demonstram serem refratárias ao vírus.

Os sinais clínicos podem ser observados entre 6 e 12 dias após a infecção. Existem duas formas clínicas da doença, a epizootica grave e a epizootica leve. Na forma grave, os sinais clínicos incluem acentuada dispneia e expectoração de muco sanguinolento, lacrimejamento e conjuntivite hemorrágica (Guy e Garcia, 2008). Na forma leve os sinais clínicos incluem depressão, redução da produção de ovos, redução do ganho de peso, conjuntivite, aumento dos seios infraorbitários e secreção nasal (Sellers *et al.*, 2004). As alterações histológicas na forma grave da doença incluem laringotraqueíte fibrinonecrótica e hemorrágica com a formação de células sinciciais contendo corpúsculos de inclusão virais intranucleares (Guy e Garcia, 2008). A forma branda ou leve é caracterizada por laringotraqueíte fibrinosa moderada e conjuntivite com corpúsculos de inclusão intranucleares ocasionais, podendo ocorrer devido a infecção proveniente de vírus vacinais (Sellers *et al.*, 2004). Após infectadas, as aves persistem com o GaHV-1 em latência por toda a sua vida (Guy e Garcia, 2008), sendo encontrado em latência nos gânglios dos nervos trigêmeos (Williams *et al.*, 1992) e na traqueia (Fuchs *et al.*, 2007).

Os principais meios de controle desta doença incluem a associação de medidas de biossegurança e vacinação (Chin *et al.*, 2009). Usualmente o controle da doença é feita pelo uso de vacinas vivas, existindo vacinas vivas de origem embrionária (CEO - *cell embryo origin*) e vacinas vivas de culturas celulares (TCO - *tissue cell origin*) (Robertson e Egerton, 1981). As vacinas vivas atenuadas possuem a capacidade de reversão de virulência após múltiplas passagens em aves não vacinadas (Guy *et al.*, 1991), ocorrendo periodicamente surtos de LTI em países endêmicos, causados por vírus de origem vacinal (Johnson *et al.*, 2010). Como alternativa para o uso de vacinas vivas, vacinas recombinantes vetorizadas foram desenvolvidas para o controle da LTI (Dufour-Zavala, 2008). Estas vacinas utilizam como vetor o *Avipoxvirus fowlpox* (FPV) (Sun *et al.*, 2008; Vagnozzi *et al.*, 2012), o *Meleagrid herpesvirus 1* dos perus (HVT) (Saif, *et al.*, 1994) e o vírus lentogênico da doença de Newcastle (Sun, *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2014). A finalidade é a expressão de genes do GaHV-1 e proteção múltipla.

O GaHV-1 foi detectado pela primeira vez no Brasil em 1973, no estado do Rio de Janeiro (Hipólito *et al.*, 1974). No ano de 2010, foi descrito um surto de LTI em Minas Gerais, envolvendo 27 granjas de postura das cidades de Itanhandu, Itamonte Passa Quatro e Pouso Alto (Preis, 2013; Couto, 2014), ocorrendo interdição da movimentação de aves na região pela Portaria Nº 1107, de 30 de novembro de 2010. Em Minas Gerais, em agosto de 2011, a agência governamental de saúde avícola autorizou a utilização de vacinas recombinantes vetorizadas HVT-LT e FPV-LT para o controle da LTI na região (Couto, 2014). A escolha do protocolo vacinal foi de livre arbítrio pelas granjas da região, existindo assim granjas sem vacinação, granjas utilizando HVT-LT, granjas utilizando FPV-LT e granjas utilizando em conjunto HVT-LT e FPV-LT.

Objetiva-se investigar a ocorrência de infecção e doença por GaHV-1 em galinhas de postura que receberam os diferentes protocolos vacinais com vacinas vetorizadas, provenientes da região interditada em Minas Gerais por meio de avaliação macroscópica, histopatológica, detecção de DNA do VLTI por PCR, detecção de anticorpos por ELISA e sequenciamento genético.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 – Histórico

O termo laringotraqueite infecciosa aviária (LTI) foi inicialmente adotado em 1931 por um comitê especial em doenças aviárias da *American Veterinary Medical Association* (Cover, 1996). Inicialmente foi descrita com diferentes nomes incluindo laringotraqueíte, laringotraqueíte infecciosa, difteria aviária (Beach, 1930; Graham *et al.*, 1930), bronquite infecciosa (Beach, 1926; Beaudett, 1930; Hinshaw, 1925; Hinshaw, 1931), traqueolaringite (May e Tittsler, 1925), havendo também referências de nomes como gripe das galinhas e gripe canadense (Cover, 1996).

O agente etiológico da LTI foi comprovado por Beaudette em 1937, pela recuperação de um vírus por filtração, o vírus da laringotraqueite infecciosa aviária (VLTI). Em 1934, Brandly e Bushnell desenvolveram um método de imunização em galinhas baseado na aplicação de uma estirpe virulenta na cloaca de aves não doentes, tornando assim a LTI a primeira doença viral aviária com o desenvolvimento de uma vacina eficaz em seu controle.

Subsequente ao reconhecimento da doença, a LTI foi diagnosticada pela primeira vez em diferentes países; em 1925 no Canadá (Gwatkin, 1925), 1935 na Austrália (Seddon e Hart, 1935), e na Inglaterra (Dobson, 1935), 1940 na Suécia (Magnusson, 1940), 1946 na Holanda (Van Heelsbergen, 1929), 1948 na Polônia (Marek, 1948), 1959 na Alemanha (Fritzsche e Gerriers, 1959) e em 1965 na Finlândia (Rislahti, 1965). Estes dados foram tabulados e documentados por Cover (1996). Na América do Sul, há relatos de surtos de LTI ou detecção do VLTI na Argentina, Equador, Paraguai (Parra *et al.*, 2016), Peru (Leisequia, 2013), Bolívia, Colômbia, Uruguai, Chile (Hidalgo, 2003; Back e Leão, 2003) e o uso de vacinas vivas atenuadas contra LTI na Venezuela (Quiroz *et al.*, 1982). Em diversos continentes e países, com produção intensiva de aves e grande concentração de granjas com aves de múltiplas idades, a doença permanece endêmica (Hidalgo, 2003; Parra *et al.*, 2016). São citados como países endêmicos há mais de dez anos os Estados Unidos, Canadá, México, África do Sul, Austrália, China, Noruega, Reino Unido e França. Os países que apresentaram a doença entre os anos de 2000 e 2013, são o Brasil, Bolívia, Peru, Namíbia, Líbia, Itália, Áustria, Índia, Indonésia e Rússia (Menendez *et al.*, 2014).

2.2 – LTI no Brasil

O VLTI foi detectado pela primeira vez no Brasil em 1973, no estado do Rio de Janeiro, onde galinhas apresentaram sinais respiratórios, traqueíte hemorrágica acentuada e mortalidade na cidade de Petrópolis (Hipólito *et al.*, 1974). Em 1980, ocorreu o isolamento e a caracterização do VLTI de baixa patogenicidade em frangos de corte (Soares *et al.*, 1980). Entre os anos de 1981-1982 houve um surto com mortalidade de 5,5% e queda de postura em poedeiras comerciais do Rio de Janeiro (Araújo *et al.*, 1982). Em 1995, por sorologia, anticorpos contra o VLTI foram detectados em aves de granjas do Rio Grande do Sul (Vargas, 1995). Em 2001-2002 houve a identificação do VLTI em aves provenientes das regiões Sul. O DNA viral foi identificado em amostras de *swabs* e tecido traqueal de poedeiras comerciais (Beltrão *et al.*, 2003) e em frangos de corte com sinais respiratórios (Beltrão *et al.*, 2004). No ano de 2002, um surto de LTI foi relatado em aves postura de granjas do município de Bastos, no Estado de São Paulo, acometendo 182 granjas comerciais de postura (Chacon e Ferreira, 2009). Neste período, Ito *et al.* (2003) documentaram a ocorrência de LTI em aves poedeiras dessa região de Bastos. A suspeita de LTI em galinhas de postura de ovos comerciais da região de Bastos, foi notificada em 27/12/2002 ao Serviço de Defesa Sanitária Animal (Buchala, 2008). A caracterização das estirpes do VLTI dessa região foi realizada posteriormente por estudos moleculares (Villareal *et al.*, 2004). Em 2005, em quatro momentos distintos, foi realizado isolamento viral em perus que apresentavam sinais respiratórios sugestivos de LTI (Portz *et al.*, 2008).

A segunda notificação ao Ministério da Agricultura sobre os focos de LTI no Brasil foi realizada em 2010 (Itanhandú, MG). No ano de 2010, o surto de LTI em Minas Gerais, envolveu 27 granjas de postura dos municípios de Itanhandu, Itamonte, Passa Quatro e Pouso Alto (Preis *et al.*, 2013; Couto *et al.*, 2015), ocorrendo interdição da movimentação de aves na região pela Portaria Nº 1107, de 30 de novembro de 2010. A infecção foi detectada também em galinhas de subsistência da mesma região (Preis *et al.*, 2014).

Entre os anos de 2012 e 2013, um estudo sorológico no Distrito Federal realizado em galinhas de subsistência, verificou prevalência de 48,26% de anticorpos contra o VLTI (Tocantins, 2014). Amostras provenientes de aves comerciais entre os anos de 2011 e 2014, dos Estados de São Paulo e Pernambuco, foram positivas na PCR para o VLTI (Parra *et al.*, 2015). Em 2016, o Instituto de Defesa Agropecuária do Estado de Mato Grosso (INDEA-MT) enviou amostras de frangos de corte com a suspeita da doença para o Laboratório Nacional

ou excreção, situação que pode ser revertida em ocasiões de estresse (Kaleta, 1990; Franco e Roehle, 2007).

Os herpesvírus estão entre os maiores e mais complexos vírus. Seus vírions variam de 200-250 nm de diâmetro, com o material genético consistindo de uma fita dupla de DNA com um genoma variando de 125-245 kbp envelopados em um capsídeo icosaédrico com cerca de 125 nm de diâmetro. O capsídeo por sua vez está incorporado em uma matriz conhecida como tegumento que contém proteínas codificadas pelo vírus, envolto em uma membrana lipídica contendo várias glicoproteínas virais (Davison, 2002). Avaliações utilizando microscopia eletrônica demonstraram que o GaHV-1 apresentam morfologia de herpesvírions, com capsídeos apresentando 100 nm de diâmetro, e as partículas virais variando entre 200 e 350 nm, pois o GaHV-1 tende a incorporar grande quantidade de proteínas do tegumento (Granzow *et al.*, 2001). A LTI é causada por um vírus pneumotrópico da ordem *Herpesvirales*, família *Herpesviridae*, gênero *Iltovirus*, da subfamília *Alphaherpesvirinae*. Taxonomicamente, este vírus é classificado como *Gallid herpesvirus 1* (GaHV-1) (Davison, 2005 - *International Committee of Taxonomy of Viruses*, 2018).

O GaHV-1 possui seu genoma constituído de DNA com uma fita dupla linear, com aproximadamente 155 kb contendo uma região longa única (UL) de 120 kb e uma região curta única (US) de 17 kb, flanqueada por regiões chamadas de sequências repetidas invertidas (IR e TR) com nove kb cada uma (Johnson *et al.*, 1991). Essas regiões contêm em torno de 48% de resíduos de guanina (G) e citosina (C) (Fuchs *et al.*, 2007). As glicoproteínas virais são codificadas pelo genoma viral e são responsáveis pelas respostas imune humoral e celular do hospedeiro. As principais glicoproteínas neste processo são as de peso molecular 205, 160, 115, 90 e 60 k (York e Fahey, 1987).

No genoma do GaHV-1 há onze regiões codificadoras de proteína, *open reading frame* (ORF), que são conservadas com homologia a aquelas encontradas no *Herpesvirus simplex tipo 1* (HSV), denominadas glicoproteínas gB, gC, gD, gE, gF, gG, gH, gI, gL, gM e gN (Fuchs *et al.*, 2007).

Antes do início do ciclo de replicação viral, um alfa peptídeo é responsável pela regulação da expressão gênica no início da infecção, sendo esta a proteína da célula infectante 4 (ICP4), homóloga a encontrada no HSV (Courtney e Benyesh Melnick, 1974). A proteína é responsável pela mudança da expressão gênica imediata-precocce para a precocce e a tardia (Dixon e Schaffer, 1980, Johnson, *et al.* 1995). O ICP4 também tem um papel importante na regulação negativa da sua própria expressão e de outros genes, ligando-se diretamente a locais

de alta afinidade dentro dos promotores dos genes do HSV (Johnson *et al.*, 1995). A ORF codificante da ICP4 possui 4.386 nucleotídeos, contendo dois domínios de alta homologia que têm sido relatados como sendo regiões conservadas entre os alphaherpesvírus. A ICP4 é uma região funcionalmente importante, sendo relacionada com a regulação gênica (Fuchs *et al.*, 2000).

O gene responsável pela expressão da timidina quinase (TK) possui 5.4 kb, localizada na UL23, entre genes altamente conservados como o gene de capsídeo p40, um gene decodificador de proteína antigênica, análoga a proteína presente no vírus *Epstein-Barr* e um gene decodificador de uma proteína envolvida na fusão celular. O TK não é essencial para a replicação viral em cultura celular, podendo ser deletado na produção de vacinas vivas atenuadas (Griffin e Boursell, 1990). O gene TK, assim como o ICP4 são usualmente utilizados para a identificação e diferenciação de isolados de alta ou baixa virulência por meio de métodos moleculares (OIE, 2014).

2.4- Epidemiologia

Galinhas de todas as idades são susceptíveis e os hospedeiros primários deste vírus, porém aves com mais de três semanas de idade são consideradas mais sensíveis (Ou e Giambrone, 2012). O VLTÍ também infecta e causa doença, já relatada em híbridos de galinhas (Guy e Garcia, 2008), faisões e pavões (Crawshaw e Boycott, 1982; Hilbink, 1985), perdizes (Guy e Garcia, 2008) e perus (Guy e Garcia, 2008; Portz *et al.*, 2008). O VLTÍ já foi isolado em galinhas d'angola com histórico de sinais respiratórios (Bautista, 2003) e em patos apenas foi realizada detecção de anticorpos contra o VLTÍ (Yamada *et al.*, 1980). Ovos embrionados de perus e galinhas são susceptíveis ao VLTÍ. Ovos embrionados de patos também são susceptíveis, porém com menor intensidade e ovos de pombos e galinhas d'angola não são susceptíveis (Jordan *et al.*, 1967). Algumas espécies de aves como estorninhos, pardais, corvos, pombos, patos (Guy e Garcia, 2008), canários, periquitos, galinha d'angola e codornas japonesas demonstram serem refratários ao vírus (Hilbink, 1985).

As vias naturais de entrada do GaHV-1 ao organismo da ave são o sistema respiratório superior e a ocular (Jordan *et al.*, 1967; Robertson e Egerton, 1981). Ingestão também é considerada como forma de infecção (Robertson e Egerton, 1981), porém o tropismo do VLTÍ para o sistema digestório é questionável (Fuchs *et al.*, 2007). Contudo, foi documentada a ocorrência de lesões de LTI com células sinciciais e corpúsculos de inclusão intranucleares no

epitélio da faringe e esôfago em duas aves de subsistência (Sary *et al.*, 2017). As principais rotas de transmissão ocorre por contato direto de aves saudáveis com aves doentes e/ou aves carreadoras do vírus em latência no organismo, cujas secreções podem estar presentes na água de bebida, poeira e fômites contendo partículas virais (Ou *et al.*, 2011). A forma indireta pode ocorrer pelo contato com fontes carreadoras como cama contaminada, besouros do esterco, cães, gatos, corvos e por tratadores com vestuário sem lavagem e desinfecção adequada (Kingsbury e Jungherr, 1958). A transmissão de partículas virais por via aérea entre granjas também pode ocorrer (Johnson *et al.*, 2005).

Aves que se recuperaram da doença e aves vacinadas com vacinas vivas atenuadas se tornam carreadoras do vírus que permanece em latência por toda a sua vida (Bagust, 1986). Em condições de estresse o vírus pode ser reativado espontaneamente (Hughes *et al.*, 1989). Os locais onde o DNA viral pode ser detectado em latência incluem os gânglios dos nervos trigêmeos (Williams *et al.*, 1992, Couto *et al.*, 2015) e a mucosa da traqueia (Fuchs *et al.*, 2007, Couto *et al.*, 2015).

Plantéis de aves de fundo de quintal representam uma importante fonte de infecção a plantéis comerciais. Aves de granjas comerciais localizadas em um raio de 1,6 Km de plantéis de aves de subsistência, possuem 36 vezes maior chance de serem infectadas pelo VLTII do que aquelas fora deste raio, pois, aves de subsistência que sobrevivem a doença se tornam carreadoras do vírus latente (Johnson *et al.*, 1991).

2.5 - Infecção e patogênese

O epitélio respiratório é o tecido de escolha para a replicação viral. A laringe e a traqueia são os locais de replicação e lesão mais acentuadas. Em outras membranas mucosas também pode ocorrer replicação viral e lesão, como a conjuntiva, mucosa das conchas nasais, sacos aéreos e epitélio bronquial e pulmonar (Bagust, 1986; Williams *et al.*, 1992). Os sinais clínicos usualmente aparecem entre 6 a 14 dias após a exposição natural (Jordan, 1966). Inoculações experimentais por via intratraqueal demonstraram que o pico dos sinais clínicos varia de 4 a 7 dias após a inoculação (Oldoni *et al.*, 2009). Outras vias de inoculação como oral, nasal, conjuntival e inoculação no músculo peitoral, resultaram também em replicação viral no epitélio traqueal. A replicação viral ocorre somente durante a primeira semana após a infecção, porém baixos níveis de partículas virais podem ser detectados 10 dias após a infecção (Bagust, 1986; Williams *et al.*, 1992).

2.6 – Patologia

Surtos de LTI apresentam alta morbidade, com 90% a 100% das aves acometidas. Na forma grave a taxa de mortalidade varia entre 5% a 70% (Seddon e Hart, 1935; Guy e Garcia, 2008) usualmente variando entre 10% - 20% (Beach, 1926; Seddon e Hart, 1935; Bagust e Guy, 1997). Na forma leve, a taxa de morbidade é menor que 5% e a de mortalidade varia em torno de 0,1% a 2% (Seddon e Hart, 1935; Linares *et al.*, 1994; Bagust *et al.*, 2000). Os sinais clínicos característicos da LTI incluem descarga nasal e estertores úmidos seguidos de tosse, respiração ofegante, espirros, depressão e conjuntivite (Beach, 1926; Kernohan, 1931).

Existem duas formas clínicas da doença, a epizootica grave e a epizootica leve. Na forma grave, os sinais clínicos também incluem dispneia acentuada e expectoração de muco sanguinolento, lacrimejamento dos olhos e conjuntivite hemorrágica. No exame macroscópico da traqueia são características a hemorragia acentuada e o exsudato fibrinonecrótico, também chamado de “tampão” de fibrina, obstruindo o lúmen (Beach, 1926; Hinshaw *et al.*, 1931; Jordan, 1958; Seddon e Hart, 1935; Guy e Bagust, 2003). Na forma epizootica leve, os sinais clínicos incluem depressão, queda da produção de ovos, redução do ganho de peso, conjuntivite hemorrágica, aumento dos seios infraorbitários e secreção nasal persistente (Sellers *et al.*, 2004). O curso da infecção varia com a severidade dos sinais clínicos e lesões. Usualmente, quando a doença não é fatal, as galinhas podem se recuperar entre 10-14 dias, variando de 1 a 4 semanas (Beach, 1926; Hinshaw *et al.*, 1931; Jordan, 1966).

As lesões macroscópicas são usualmente visualizadas na laringe e traqueia, porém, eventualmente, também podem ser identificadas na conjuntiva e em outros epitélios respiratórios. As lesões na traqueia e outros órgãos podem ser leves, somente com aumento da quantidade de muco, caracterizando conjuntivite, sinusite e traqueíte mucoides (Davidson *et al.*, 1988; Linares *et al.*, 1994). Quando acentuadas, há hemorragia acompanhada de necrose. Na forma acentuada, degeneração, necrose e hemorragia acontecem em estágios mais avançados da doença. Em alguns casos, pode ocorrer somente a secreção mucoide por toda a extensão da traqueia. Em outros casos, hemorragia acentuada no epitélio da traqueia resulta na formação de coágulos sanguíneos, exsudato muco sanguinolento e fibrinonecrótico no lúmen da traqueia. Por extensão, o processo inflamatório pode atingir os brônquios pulmonares e sacos aéreos. Na forma leve, macroscopicamente, usualmente ocorre edema e hiperemia do epitélio da conjuntiva e seios infraorbitais (Hidalgo, 2003).

As lesões histológicas na forma grave da doença incluem laringotraqueíte fibrinonecrótica e hemorrágica com a formação de células sinciciais contendo corpúsculos de inclusão virais intranucleares e descamação para o lúmen (Guy e Garcia, 2008). A forma leve é caracterizada por laringotraqueíte fibrinosa moderada e conjuntivite com corpúsculos de inclusão intranucleares ocasionais, podendo ser decorrente de infecção proveniente de vírus vacinais (Sellers *et al.*, 2004).

Inicialmente, as alterações microscópicas incluem a perda de células caliciformes e infiltrado de células inflamatórias, na mucosa do epitélio traqueal. Com o progresso da infecção, a mucosa se torna edemaciada com aumento de volume das células e perda de cílios. Entre dois e três dias após a infecção, há a formação de células multinucleadas (células sinciciais) e há a migração de linfócitos, histiócitos e plasmócitos para a mucosa e submucosa. Posteriormente, há lise celular e descamação, resultando na exposição da superfície da mucosa por ausência total da camada epitelial ou somente com uma fina camada de células basais, podendo acarretar na protrusão dos vasos sanguíneos e lâmina própria no lúmen da traqueia. Hemorragia pode ser visualizada em casos onde ocorre destruição acentuada do epitélio respiratório e descamação com exposição e ruptura dos vasos sanguíneos. Os corpúsculos de inclusão intranucleares são observados em células epiteliais por volta do terceiro dia após a infecção (Purcell, 1971; Hidalgo, 2003). Os corpúsculos de inclusão usualmente estão presentes somente nos estágios iniciais da infecção, durante os primeiros cinco dias (Guy *et al.*, 1992; VanderKop, 1993), com desaparecimento destes com o decorrer da infecção, resultante da necrose e descamação das células epiteliais (Hidalgo, 2003). Os corpúsculos de inclusão dos herpesvírus são acúmulos de partículas virais estruturadas, proteínas e genoma. Inicialmente, os corpúsculos de inclusão são basofílicos e nomeados *Cowdry* tipo B. Posteriormente, esse corpúsculo encolhe formando um “halo” e se torna eosinofílico, então designado *Cowdry* tipo A. Neste estágio, as partículas virais se encontram no citoplasma onde em seguida são liberadas da célula ocorrendo a degeneração da célula sincicial (Cowdry, 1934).

2.7 – Diagnóstico

O diagnóstico clínico presuntivo de LTI epizootica grave e aguda pode ser baseado nas altas taxas de mortalidade e na expectoração de exsudato muco sanguinolento, sinais clínicos estes sugestivos de LTI. Entretanto, na forma epizootica leve, os sinais são inespecíficos, pois outros patógenos aviários podem causar sinais clínicos e lesões macroscópicas semelhantes,

como a bronquite infecciosa das galinhas (Tripathy, 1998) e a micoplasmose (Scholz *et al.* 1994). O diagnóstico da infecção por GaHV-1 requer auxílio laboratorial e requer mais de uma técnica para a identificação definitiva. Avaliação histopatológica, isolamento viral, detecção dos antígenos virais e detecção do DNA viral são os métodos diagnósticos mais usualmente utilizados (Tripathy e García, 2008). A associação de dois ou mais testes é recomendada para o diagnóstico da doença e da infecção (Crespo *et al.*, 2007).

O VLTi pode ser isolado em cultura de células hepáticas (McNulty *et al.*, 1985) erenais de galinhas (Chang *et al.*, 1960) ou em embriões de pintinhos (Van Kammen e Spadbrow, 1976). A cultura em células hepáticas é considerada a mais sensível (Hughes e Jones, 1988). O vírus também pode ser isolado em membrana corioalantóide de embriões provenientes de ovos SPF (*specific pathogen free*) entre 10 a 12 dias de incubação (Jordan, 1964).

O GaHV-1 também pode ser identificado por microscopia eletrônica em exsudato de traqueia de aves doentes (Van Kammen e Spadbrow, 1976). Os antígenos virais podem ser detectados por imunofluorescência (Braune e Gentry, 1985; Wilks e Kogan, 1979) ou por ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) utilizando o soro das aves (Uddin *et al.*, 2014) ou suabes da mucosa traqueal (York e Fahey, 1988). A avaliação histopatológica da traqueia proporciona a identificação das lesões típicas (patognomônicas), como a traqueíte fibrino-necrótica (difétrica) com descamação epitelial e formação de sincícios contendo corpúsculos de inclusões intranucleares (Armstrong, 1959; Pirozok *et al.*, 1957). Métodos de detecção do GaHV-1 pela reação em cadeia de polimerase (PCR) são descritos como mais sensíveis do que o isolamento viral (Alexander e Nagy, 1997; Keam *et al.*, 1991; McNulty *et al.*, 1985; Williams *et al.*, 1994).

O exame histopatológico é um método padrão de diagnóstico, considerado rápido e altamente específico quando realizado com os tecidos de forma adequada. As lesões produzidas pelo VLTi têm caráter patognomônico, com a presença de células sinciciais e corpúsculos de inclusão intranucleares no epitélio respiratório e conjuntival que podem ser identificados quando corados por hematoxilina e eosina ou Giemsa (Guy *et al.*, 1992). As aves selecionadas para este exame devem estar na fase aguda da doença, e a traqueia, conjuntiva e pulmões devem ser imediatamente fixados em solução de formol a 10%, tamponado e neutro (Preis *et al.*, 2014) ou solução de Bouin (OIE, 2014).

PCR convencional associada a histopatologia são técnicas utilizadas para diagnóstico rápido da LTI. A técnica de PCR é mais sensível do que o isolamento viral, permitindo a identificação do DNA viral em amostras que podem estar contaminadas com outros

microrganismos (Williams *et al.*, 1994). Durante o curso médio e final da infecção pelo VLTi, a PCR e o isolamento viral apresentam sensibilidade semelhantes, porém a PCR tem sensibilidade superior na fase de recuperação da doença (Alexander e Nagy, 1997). Na PCR convencional, para o diagnóstico do VLTi, oligonucleotídeos provenientes do gene da timina quinase (TK) e do gene ICP4 são os mais utilizados (OIE, 2014). Oligonucleotídeos que amplificam um segmento do gene ICP4 foram os mais eficientes na PCR convencional nos diagnósticos realizados por Chacon *et al.* (2009) e Preis *et al.* (2014).

Os métodos sorológicos são mais indicados como ferramentas de avaliação da soroconversão induzida pelo uso de vacinas do que como métodos de diagnóstico da doença. O teste de ELISA possui alto nível de sensibilidade, rápida execução e capacidade de análise de um grande número de amostras. É indicado para a detecção e quantificação de anticorpos contra o VLTi (Bauer *et al.*, 1999). ELISA é um teste de sensibilidade maior do que a neutralização sérica, imunofluorescência direta e difusão em gel de ágar em amostras séricas de galinhas (Adair *et al.*, 1985). A detecção dos níveis de anticorpos ocorre a partir do sétimo ao décimo dia após a infecção, chegando ao pico em duas semanas. A resposta induzida por vacinas é variável e a sorologia não deve ser realizada antes de 14 dias após a vacinação (OIE, 2014).

Para a OIE (2014), a PCR é o método de diagnóstico recomendado na avaliação individual de animais livres de infecção antes de importações e como um dos métodos auxiliares na identificação de casos clínicos. O ELISA é recomendado juntamente com a PCR para auxiliar na detecção de casos clínicos, no monitoramento da prevalência de infecção e no *status* imune individual ou populacional após a vacinação contra LTI. A histopatologia com a lesão clássica possibilita o diagnóstico confirmatório da doença.

2.8– Controle

Os principais meios de controle desta doença incluem a associação de medidas de biossegurança e vacinação (Chin *et al.*, 2009). Medidas de controle com cooperação entre agências governamentais e setor produtivo são as mais desejáveis. O diagnóstico rápido, a implementação do controle da vacinação e prevenção da disseminação do vírus para outras áreas são de grande importância, sendo propostos programas de controle para focos da LTI por Dufour-Zavala (2008). Após um diagnóstico positivo, interdição da região com medidas de higienização, desinfecção, quarentena, controle do trânsito de pessoas, alimentos, equipamentos e aves potencialmente infectadas e o uso de sistemas de informação geográficas

são essenciais para a prevenção e controle da LTI (Halvorson, 2011). Na região com granjas cujas aves foram acometidas pela LTI em Minas Gerais, foi implementada a portaria 1107 de 30 de novembro de 2010 (Anexo 1), visando o controle e contenção do foco.

Surtos de LTI provenientes do vírus de campo ou por vacinação com vacinas vivas irão estabelecer a infecção latente nas aves, sendo de extrema importância evitar o contato destas aves vacinadas ou recuperadas da doença com aves susceptíveis (Bagust, 1986).

O VLTI tem a capacidade de sobreviver em exsudatos de traqueia e carcaças de aves infectadas por um período de 10-100 dias em temperaturas variando de 13°C a 23°C. O VLTI se mantém viável entre 3-20 dias na cama profunda e por pelo menos 3 dias em dejetos sob as gaiolas. O contato direto com a luz torna o vírus mais vulnerável a inativação (Dufour-Zavala, 2008). Por ser tratar de um vírus envelopado, é sensível a agentes lipolíticos como clorofórmio e éter (Fitzgerald e. Hanson, 1963). O VLTI é prontamente inativado por desinfetantes comuns, porém a eficácia da desinfecção é prejudicada pela presença de matéria orgânica (Dufour-Zavala, 2008). Soluções constituídas de 5% de fenol, 3% de cresol ou 1% de hidróxido de sódio promoveram a inativação do vírus em menos de um minuto (Schnitzlein *et al.*, 1994). Outros métodos de redução da viabilidade do vírus incluem a aplicação de calor e compostagem da cama (Dufour-Zavala, 2008). O vírus é inativado quando exposto a 55°C ou 56°C em 15 minutos, ou em 48 horas quando exposto a 38°C (Kernohan, 1931).

No Brasil, no surto de LTI ocorrido nas granjas da região de Bastos (SP) foram autorizadas a utilização de vacinas vivas atenuadas (CEO e TCO) estabelecendo uma zona de vacinação e um programa de controle criando uma área interdita para a saída de aves vivas. Posteriormente, a vacina CEO foi proibida em 2009 e a vacina TCO em 2012, respectivamente, e substituídas pelas vacinas vetorizadas, utilizadas até o presente momento (Buchala, 2008; Chacon *et al.*, 2015). Em Minas Gerais, em agosto de 2011, a agência governamental de saúde avícola autorizou e implementou a utilização de vacinas vetorizadas contra LTI nas granjas das Terras altas da Mantiqueira. As vacinas autorizadas na região foram a vacina HVT-LT e a FPV-LT. A HVT-LT é aplicada no incubatório, via subcutânea no dorso do pescoço das pintinhas no primeiro dia de vida, após a sexagem e seleção das fêmeas para a produção de ovos. Esta protege a ave da doença de Marek e LTI. A FPV-LT é aplicada aos 21-35 dias de idade na membrana da asa e protege a ave da boubia aviária e LTI. A utilização destas vacinas na região não foi compulsória, possibilitando a cada granja a sua implementação ou não, bem como, a utilização de diferentes protocolos vacinais. Assim, houveram granjas sem vacinação contra LTI, granjas utilizando somente a HVT-LT ou a FPV-LT e granjas utilizando ambas as vacinas (Couto, 2014).

2.9 – Vacinas

A LTI foi o primeiro patógeno aviário controlado por meio de vacinação (Brandly e Bushnell, 1934). As vacinas disponíveis incluem as vacinas vivas de origem embrionária (CEO - *cell embryo origin*), vacinas vivas de culturas celulares (TCO - *tissue cell origin*) e vacinas recombinantes vetorizadas (Dufour-Zavala, 2008). Usualmente, o controle da doença é realizado pelo uso de vacinas vivas TCO ou CEO, por via ocular, água de bebida ou por *sprays* de aspersão, respectivamente, permitindo vacinação em massa. O sucesso da vacinação por meio da água de bebida depende da capacidade do vírus vacinal entrar em contato com o epitélio respiratório das aves, por meio da aspiração deste pelas narinas ou pela coana, porém esta rota de vacinação não garante uma vacinação uniforme das aves (Robertson e Egerton, 1981). A administração incorreta das vacinas vivas por meio de aspersão pode resultar em reações adversas como a atenuação insuficiente do vírus, penetração do vírus na mucosa respiratória inferior devido a gotas muito pequenas (Purcell e Surman, 1974) ou uma dosagem excessiva (Clarke *et al.*, 1980).

Experimentalmente, foi demonstrada a capacidade de vírus provenientes de vacinas vivas atenuadas para LTI, em especial a vacina CEO, recuperarem a virulência após passagens consecutivas em aproximadamente dez aves não vacinadas (Guy *et al.*, 1991). Ambas vacinas vivas atenuadas, CEO e TCO, podem ser transmitidas a partir de aves vacinadas para aves não vacinadas, estabelecendo latência em aves aparentemente saudáveis (Johnson *et al.*, 2010). Estudos genotípicos de isolados de GaHV-1 de surtos de LTI na Europa, Estados Unidos e América do Sul indicaram que a grande maioria é geneticamente semelhante a vírus provenientes de vacinas CEO (Johnson *et al.*, 2010). Além disso, estudos apontam epizootias de LTI originadas de estirpes provenientes de CEO que readquiriram a virulência e persistiram no ambiente (Oldoni *et al.*, 2008).

Para se evitar o risco da reversão da virulência de vacinas vivas atenuadas, uma nova geração de vacinas recombinantes vetorizadas foi desenvolvida para o controle da LTI. Estas vacinas utilizam como vetor *Avipoxvirus fowlpox* (FPV) (Sun *et al.*, 2008; Vagnozzi *et al.*, 2012), *Meleagrid herpesvirus 1* dos perus (HVT) (Saif, *et al.*, 1994) ou vírus lentogênico da doença de Newcastle (NDV) (Zhao *et al.*, 2014). As glicoproteínas I e D do GaHV-1 foram os genes inseridos no FPV (Sun, *et al.*, 2008; Johnson *et al.*, 2010, Coppo *et al.*, 2013) resultando na vacina FPV-LT. A glicoproteína B e UL32 foi o gene inserido no HVT (Johnson *et al.*, 2010, Coppo *et al.*, 2013), resultando na vacina HVT-LT e as glicoproteínas B e D (Zhao *et al.*, 2014)

no NDV, resultando na vacina NDV-LT. Atualmente, há investimento também, na produção de vacinas modificadas. Estas são produzidas com a deleção de uma proteína ou gene não essencial para a replicação do GaHV-1 (Garcia, 2017). As características referentes as vacinais comerciais mais usualmente utilizadas apresentam-se sumarizadas na tabela 1.

Tabela 1: Características das vacinas mais utilizadas no controle da LTI.

Tipo de Vacina	Ação da vacina Antígeno/gene	Rota de administração	Vantagens	Desvantagens
Vacinas vivas atenuadas				
CEO	Vírus inteiro	Água de bebida, via conjuntival ou aspersão	Altamente protetora	Estabelece latência. Virulência residual. Reversão da virulência após passagens <i>in vivo</i> . Transmissão entre aves. Recombinação <i>in vivo</i> .
TCO	Vírus inteiro	Via conjuntival	Altamente protetora	Estabelece latência. Transmissão entre aves. Interação com vacinas de Newcastle e Bronquite infecciosa
Vacinas recombinantes vetorizadas				
FP-LT	Glicoproteína B e UL32	Pele da asa, <i>in ovo</i>	Não estabelece latência. Permite a diferenciação de animais vacinados e infectados. Permite a aplicação no incubatório.	Proteção parcial. Demora no desenvolvimento da resposta imune.
HVT-LT	Glicoproteínas I e D	Subcutâneo, <i>in ovo</i>	Não estabelece latência. Permite a diferenciação de animais vacinados e infectados. Permite a aplicação no incubatório.	Proteção parcial. Demora no desenvolvimento da resposta imune.

Modificado e adaptado de Coppo *et al.* (2013).

3. OBJETIVOS

3.1 - Objetivo geral

Investigar a ocorrência da infecção e doença por GaHV-1 em galinhas de postura da região interdita em Minas Gerais que receberam diferentes protocolos vacinais com vacinas vetorizadas.

3.2 - Objetivos específicos

- Detectar a infecção por GaHV-1 em amostras da mucosa traqueal e gânglios dos nervos trigêmeos em galinhas de postura por meio de PCR convencional;
- Identificar lesões de LTI por meio de histopatologia da laringe, traqueia e pulmões para diferenciar aves com a doença clínica de aves portadoras.
- Realizar o sequenciamento genético de amostras de GaHV-1 de diferentes anos para caracterizar se ocorreu mutação ou a entrada de estirpe viral nova ou diferente na região.
- Analisar estatisticamente os resultados para detecção do VLTi comparativamente com as demais variáveis.

4. MATERIAL E MÉTODOS

As coletas das amostras foram realizadas na região de Terras Altas da Mantiqueira – MG. As análises laboratoriais foram realizadas no Laboratório de Patologia Animal e Molecular da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (EV/UFMG) e no Laboratório de Retrovírus da EV/UFMG.

4.1 - Localizações geográficas e caracterização das granjas

A caracterização da região e das granjas foi feita com a associação de visitas técnicas na região e a utilização do *software* disponibilizado online no Google Maps®. Este foi utilizado para a medição entre as distâncias entre granjas e a localização geográfica das mesmas.

A região se encontra interdita, desde o ano de 2010, para a movimentação de aves pela Portaria Nº 1107, de 30 de novembro de 2010, devido a confirmação da presença do GaHV-

1 que ocasionou surtos de LTI. As aves amostradas foram provenientes de oito granjas distintas da região de Terras Altas da Mantiqueira em Minas Gerais (Figura 2).

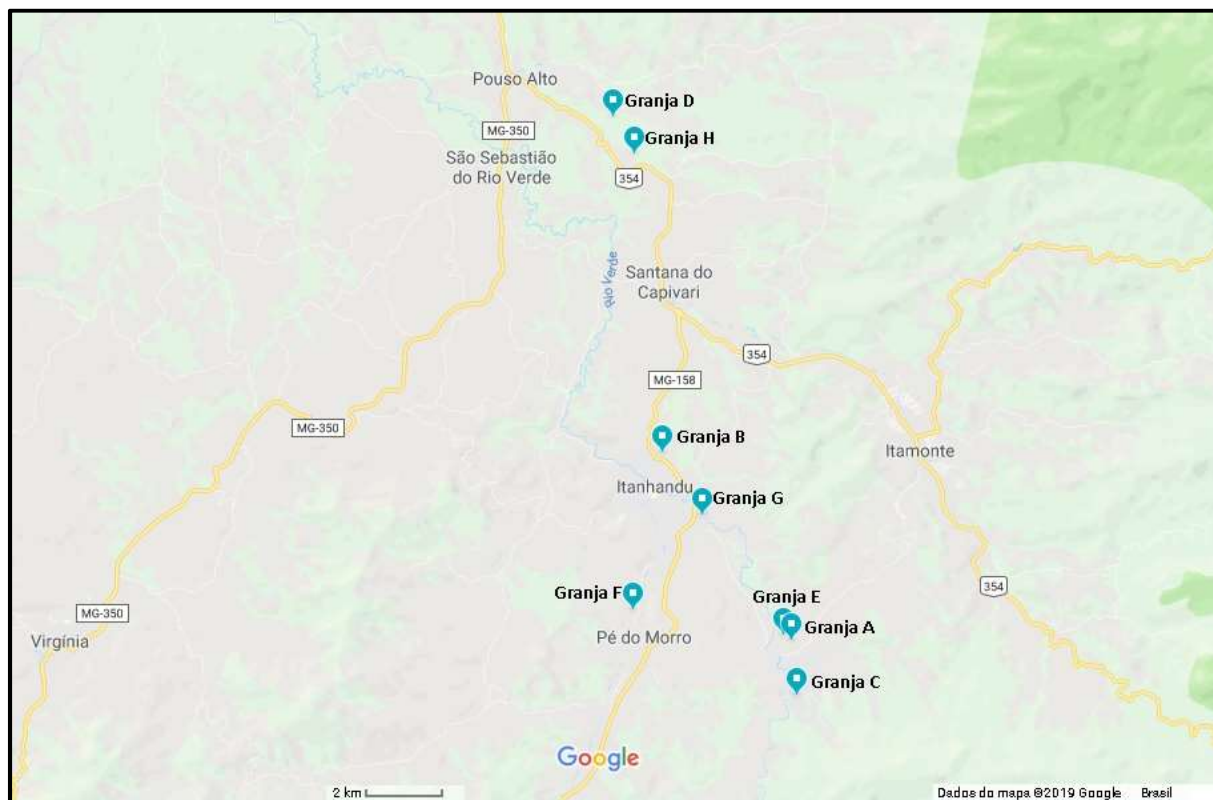


Figura 2: Localização geográfica das granjas amostradas: Imagem adaptada do software Google Maps®. Escala de 2km – Granja A – não vacinada; B – dupla, Granja C – FPV-LT, Granja D – FPV-LT, Granja E – dupla, Granja F – HVT-LT, Granja G – HVT-LT, Granja H – não vacinada.

A região, que compreende os municípios de Itanhandu, Pouso Alto, Itamonte e Passa Quatro, possui 12 granjas de postura, várias possuindo mais de um núcleo de criação (total de 27 unidades produtivas no início do projeto e reduzidas para 24 ao final). A população de aves destas granjas era de 40.000 a 3.586.000 galinhas, onde a menor granja possuía três galpões e a maior 34 galpões. Os galpões possuem diferentes níveis de tecnificação, havendo desde granjas com galpões californianos simples até granjas com galpões climatizados de 6 andares, com diferentes cenários de isolamento e biossegurança.

Em relação a presença de cerca viva como medida de biossegurança, três granjas apresentaram em todo o perímetro dos galpões, três possuíam cerca viva parcial ao perímetro dos galpões e duas não apresentavam. A distância entre as granjas amostradas e a granja mais próximas destas, variou de 30 metros a um quilômetro. Todas as granjas possuíam galpões a menos de 450 metros de uma rodovia ou área urbana próxima (Tabela 2).

Destaca-se que em muitas dessas granjas amostradas a recria de suas aves não se encontram no mesmo núcleo. Em duas granjas, há uma mesma recria para mais de uma granja onde uma não vacina e outra realiza vacinação dupla. Além disso, algumas empresas possuem mais de uma granja na região, podendo assim ocorrer uma maior proximidade física da recria com outras granjas ou um fluxo de funcionários e/ou maquinário entre granjas de uma mesma empresa.

Tabela 2: Características das granjas amostradas com relação ao número de aves e estrutura física.

Granja	A	B	C	D	E	F	G	H
Protocolo vacinal inicial	Não vacinada	Dupla	FPV-LT	FPV-LT	Dupla	HVT-LT	HVT-LT	Não vacinada
Capacidade de alojamento	40.000	558.000	200.000	199.000	3.586.000	684.000	370.000	150.000
Número de núcleos	1	12	9	5	34	13	17	2
Número de galpões	6	13	16	10	34	24	17	3
Cerca viva	Ausente	Presente	Ausente	Presente	Parcial	Parcial	Parcial	Presente
Distância até a granja mais próxima	30 m	440 m	500 m	1000 m	30 m	420 m	850 m	1000 m
Distância média até a rodovia ou área urbana mais próxima	131 m	195 m	100 m	332 m	170 m	435 m	300 m	175 m

4.2 – Amostragens por vigilância ativa

Entre julho de 2014 e fevereiro de 2017, foram amostradas 963 aves provenientes de oito granjas distintas da região de Terras Altas da Mantiqueira em Minas Gerais.

A amostragem foi realizada por meio de vigilância ativa juntamente como o serviço veterinário estadual do Instituto Mineiro Agropecuário (IMA). Em cada visita realizada no verão e no inverno, a permanência da região era de uma semana. A entrada nas granjas ocorria

apenas na primeira delas pois toda a equipe se encontrava em vazio sanitário. Nas granjas visitadas na sequência, as aves eram selecionadas pelos técnicos das granjas e amostradas externamente para evitar o contato com as outras aves dessas granjas.

As granjas foram consideradas como uma unidade produtiva por possuir manejo, trabalhadores e gerenciamento semelhantes. Nos casos das granjas com mais de uma unidade produtiva foi escolhida a unidade considerada com a situação de maior risco sanitário quanto à idade, tipo de criação e biosseguridade. Não havendo diferença entre estas, foram sorteadas aleatoriamente. Para definir o tamanho da amostragem, foi realizado o cálculo sem considerar o tamanho ou número de aves de cada granja. Justifica-se pela grande diferença de tamanho de população nas granjas e limitações técnicas, éticas e econômicas para o sacrifício das aves. Além disso, por se tratar de uma doença respiratória com alta taxa de morbidade e pela grande proximidade entre os galpões. As coletas foram efetuadas por galpão ou alternando estes nas granjas que possuíam mais de 20 galpões próximos. Foi realizado um estudo transversal considerando o protocolo de vacinação e cada granja como extrato. Portanto, as duas que não vacinavam foram consideradas as granjas controle e foram comparadas com cada extrato.

Para as amostragens, foram também, definidos alguns critérios que incluíram a estação do ano, o tamanho da população, níveis de biosseguridade e tipo de vacinação contra LTI. Foram realizadas duas coletas programadas por ano, uma no inverno (junho-agosto) e outra no verão (fevereiro). Os critérios utilizados para a amostragem (Figura 3) das aves de acordo com o tipo de vacinação utilizada por granja foram: duas granjas sem vacinação; duas granjas com HVT-LT; duas granjas com FPV-LT; e duas granjas com ambas as vacinas. Em cada granja foram selecionadas nove aves por lote separados por fase de produção, com um lote no pico de postura (25-60 semanas) e um lote no final da postura (>60 semanas de idade). Nas granjas com maior população, em cada coleta, foi amostrado um lote extra.

Quanto ao número de aves coletadas em cada granja, foi feito o cálculo pelo Statcalc-Epiinfo7® para estudos transversais considerando: expostos/não expostos 1:1, 95% de confiança, 80% de poder, frequência esperada nos não vacinados em torno de 35% e nos vacinados de 10%. Foram então selecionadas entre 18 a 36 aves por granja/coleta, separadas em lotes em média de nove aves (variando de oito a 18).

Preferencialmente, eram amostrados lotes que apresentaram sinais clínicos, particularmente agudos. Na ausência de sinais clínicos, a seleção foi aleatória em cada lote. Aves e lotes extras foram amostradas quando sinais clínicos de doença respiratória foram observados. Existiram lotes que não se enquadravam no delineamento para as coletas, como

aves na cria e recria (< 18 semanas de idade) ou ainda, fora do pico de postura (< 24 semanas de idade). Nestes lotes foram amostradas duas a 15 aves.

As aves amostradas foram clinicamente examinadas, eutanasiadas pelo método de deslocamento cervical, necropsiadas para exame macroscópico e coleta das amostras. No momento da visita às granjas para a coleta, foi aplicado um questionário epidemiológico incluindo número de aves do lote a ser amostrado, idade das aves, data de início e quais sinais clínicos apresentados.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), com o número de protocolo 78/2014 (Anexo 2), juntamente com os termos de consentimento dos proprietários ou responsáveis pelas granjas (Anexo 3).

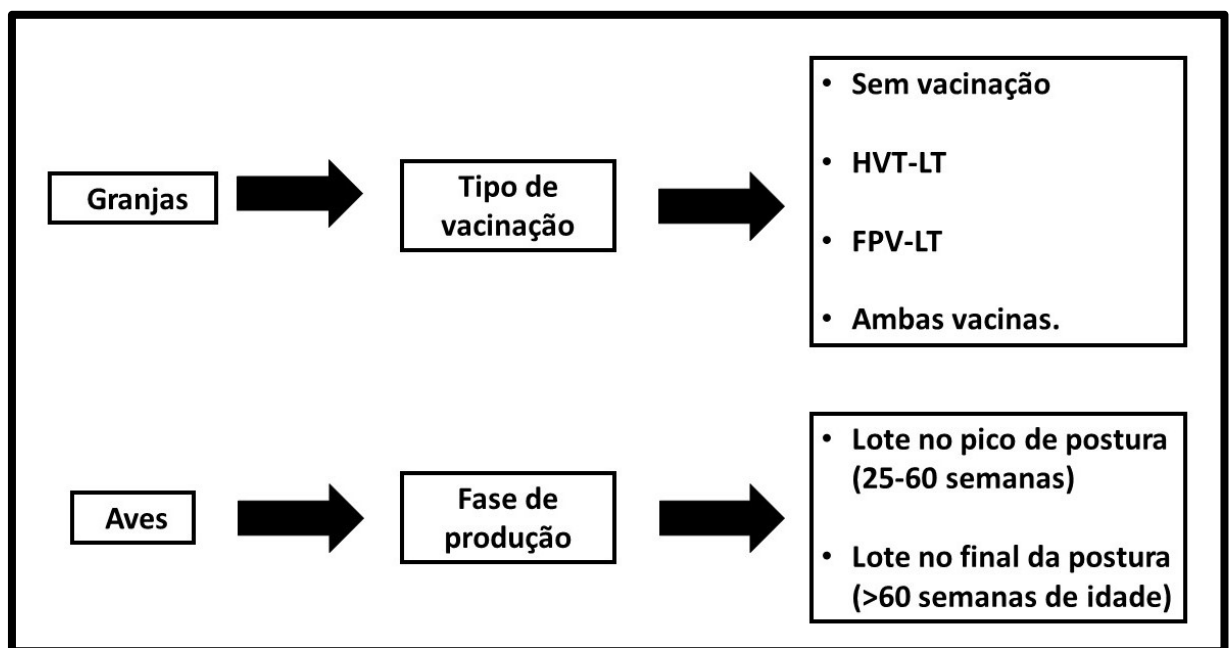


Figura 3: Organograma de amostragem. Realizou-se a seleção de duas granjas por cada esquema de protocolo vacinal e para cada granja houve a seleção de lotes de aves por fase de produção, onde cada amostra era composta por nove aves.

4.3 – Dados meteorológicos

As médias de temperatura mínimas e máximas referentes aos meses de amostragem e referentes ao período dos surtos de doença respiratória foram obtidas, do site do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (<http://www.inmet.gov.br>). Estes registros são provenientes da estação meteorológica do município de São Lourenço – MG, o mais próximo geograficamente da região.

4.4 - Coleta e processamento de amostras

Todos os animais foram eutanasiados pelo método de deslocamento cervical e, em seguida, necropsiados e examinados macroscopicamente. Amostras individuais de laringe, traqueia e pulmões foram coletados separadamente, por ave, para a histopatologia. Para aves com doença clínica, conjuntiva e conchas nasais foram também coletadas para exame. As amostras foram fixadas em formol tamponado neutro a 10% durante 48 a 52 horas. Amostras individuais da porção medial da traqueia e gânglios dos nervos trigêmeos (Figura 4 A e B) foram coletadas. Para este procedimento as pinças, tesouras e alicates eram higienizados com água e detergente e em seguida mergulhados em álcool, antes da coleta individual de cada órgão para cada ave, para evitar contaminação cruzada. Em seguida os tecidos eram armazenados individualmente em microtubos e congelados a -20° C para os exames moleculares.

Nas coletas do inverno de 2016 e verão de 2017, além do material já coletado usualmente, antes da eutanásia, individualmente, também foi realizada a coleta de sangue da veia ulnar ou punção cardíaca para a realização do ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) para a detecção de anticorpos contra o VLTI.

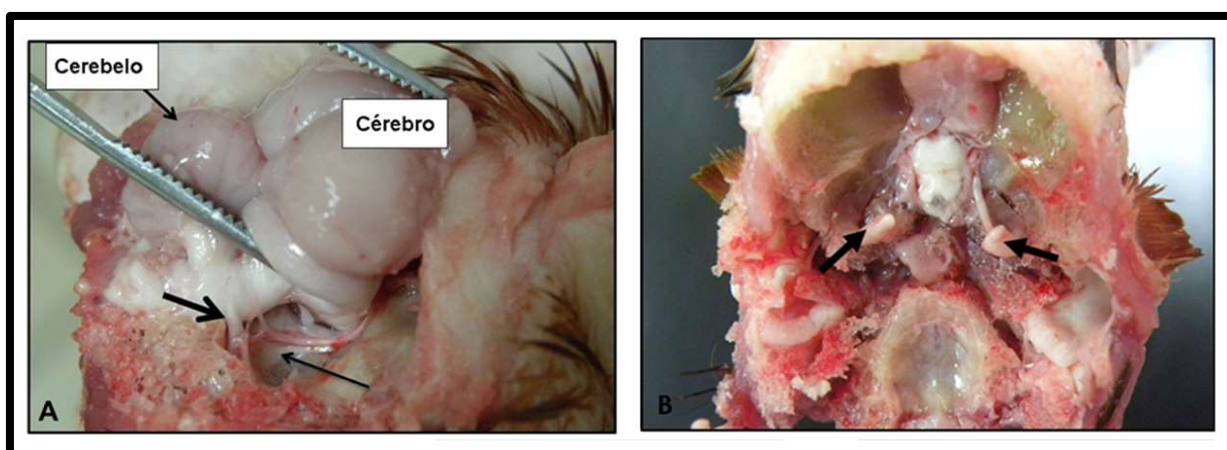


Figura 4. Galinha de postura. A e B: Localização anatômica do nervo e GTs (setas).

4.5 - Macroscopia e histopatologia

Durante a necropsia das aves foi realizada a avaliação macroscópica dos órgãos, com descrição detalhada das lesões encontradas. A laringe, parte proximal e distal da traqueia, pulmões e também conjuntivas e conchas nasais foram fixadas em formol tamponado neutro 10% durante 48 a 52 horas. Posteriormente, os tecidos foram clivados e processados em séries crescentes de álcool, xilol, embebidas em parafina, seccionadas a 3 µm de espessura e corados pela hematoxilina e eosina (HE). Foi confeccionada de cada ave uma lâmina histológica contendo cortes da laringe e traqueia e outra apresentando cortes do pulmão, totalizando 1.804 lâminas. Os tecidos foram examinados em microscopia de luz comum, de forma aleatória, para observação de presença ou ausência de lesões, tipo de lesão, distribuição e intensidade. Para as aves que apresentaram alterações, a descrição completa das lesões foi realizada na laringe, traqueia e pulmões e atribuído um escore referente ao escore de lesão, associando os resultados com os testes moleculares e dando um diagnóstico sugestivo da alteração por ave.

Todas as aves foram analisadas e realizada a avaliação individual em cada tecido, independentemente do tipo de alteração ou doença que estas apresentavam. Em cada um dos tecidos foram avaliados os seguintes aspectos:

- Infiltrado linfoplasmocitário difuso na lâmina própria da mucosa respiratória;
- Formação de agregado linfofolicular;
- Achatamento de epitélio com perda de cílios;
- Infiltrado heterofílico na mucosa e no lúmen;
- Presença ou ausência de exsudato fibrinoso;
- Necrose epitelial;
- Formação de células sinciciais;
- Presença de corpúsculo intranuclear tipo Cowdry A e B.

A graduação das lesões, considerando os aspectos acima, foi realizada da seguinte forma: escore 0 a 4 para cada secção de laringe, traqueia e pulmão (Tabela 3).

Aves com ausência de lesões, sem a presença de infiltrado inflamatório ou outra alteração em nenhum dos órgãos analisados, foram classificadas como escore zero. As aves que receberam escore 1, possuíam alterações referentes a reações locais associadas a resposta à administração de vacinas por via respiratória, com predominância de infiltrado linfoplasmocitário com presença ou ausência de formação linfofolicular. O escore 2 foi relacionado a alterações locais de origem infecciosa, porém com lesões focais ou multifocais

discretas a moderadas, sendo associadas a achados de infecções iniciais. As aves que receberam escore 3 foram associadas a alterações de origem infecciosa moderadas a acentuadas, sendo mais frequente em aves com LTI com lesões moderadas ou aves com lesões de micoplasmose moderadas a acentuadas. As aves que se enquadraram no escore 4 foram associadas a alterações de LTI com lesões acentuadas. Aves com lesões de traqueíte ou laringite crônicas, com perda anterior total de todo epitélio respiratório por necrose difusa, apresentando reepitelização difusa e restos sugestivos de células sinciciais foram incluídas no grau 4. Posteriormente os escores de lesões referentes a cada tecido analisado foram somados e realizada a média entre estes, sendo o resultado arredondado para o número inteiro mais próximo e formulado o diagnóstico de possível agente causador da alteração.

Tabela 3: Escore do tipo, distribuição e intensidade da lesão histológica.

Escore da Lesão					
Lesão histológica	0	1	2	3	4
Infiltrado linfoplasmocitário	Ausente	Presente – focal a multifocal discreto	Presente – focal a multifocal discreto a moderado	Presente - multifocal a focalmente extenso moderado a acentuado	Presente – multifocal, focalmente extenso ou difuso acentuado
Agregado linfocelular	Ausente	Ausente ou presente–focal a multifocal discreto	Presente ou ausente– focal a multifocal	Presente ou ausente– focal a multifocal	Presente ou ausente– focal a multifocal
Achatamento de epitélio com perda de cílios	Ausente	Ausente ou Presente– focal a multifocal discreto	Presente – multifocal discreto	Presente - multifocal a focalmente extenso moderado a acentuado	Presente – multifocal, focalmente extenso ou difuso acentuado
Infiltrado heterofílico	Ausente	Ausente	Ausente ou Presente – focal a multifocal discreto a moderado	Presente - multifocal a focalmente extenso moderado a acentuado	Presente – multifocal, focalmente extenso ou difuso acentuado
Fibrina	Ausente	Ausente	Ausente ou Presente –focal a multifocal – discreto a moderado	Presente - multifocal a focalmente extenso moderado a acentuado	Presente – multifocal, focalmente extenso ou difuso acentuado
Necrose epitelial	Ausente	Ausente	Presente– focal a multifocal discreta	Presente – focal a multifocal moderada	Presente – multifocal, focalmente extenso ou difuso acentuado
Células sinciciais	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente ou presente	Presente
Corpúsculo intranuclear	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente ou presente	Presente

4.6 – Amostragens por vigilância passiva

Entre os anos de 2014 a 2018, também foi realizada a vigilância passiva de toda a região interditada. Nas granjas em que os responsáveis identificaram lotes de aves com sinais clínicos respiratórios, os veterinários do serviço oficial do IMA regional foram notificados. Estes realizaram visitas às granjas para a necropsia e coleta das aves com sinais clínicos. As amostras das conjuntivas, conchas nasais, laringe, traqueia, pulmões e sacos aéreos foram fixadas em formol tamponado neutro 10% e encaminhados para avaliação histopatológica no Setor de Patologia Veterinária da Escola de Veterinária da UFMG. As amostras foram examinadas por histopatologia para formular o diagnóstico das causas dos sinais respiratórios. Esses dados foram compilados em uma planilha de dados. Amostras que incluíram a porção medial da traqueia (TQ) e dos gânglios trigêmeos dessas aves foram coletadas e também refrigeradas a -20° C para extração de DNA e realização da PCR para detecção do VLTI.

4.7 - Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Amostras de traqueia e gânglios dos nervos trigêmeos foram coletadas, armazenadas em microtubos estéreis e congeladas a -20° C para realização da reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção do DNA do VLTI. Para cada ave foi realizada a PCR dos GTs e traqueia. Para controle endógeno da extração de DNA, as amostras negativas na PCR para o gene ICP4, foram testadas para o gene da actina β (Li *et al.*, 2005).

Para a extração de DNA, as amostras de traqueia foram abertas individualmente em placas de Petri individuais e tiveram a mucosa raspada com uma lâmina de aço cirúrgica estéril. O conteúdo obtido foi transferido para microtubos estéreis livre de DNA/RNase. Os gânglios dos nervos trigêmeos também foram transferidos para microtubos estéreis livre de DNA/RNase, e foram macerados com pistilos individuais. Em seguida, o raspado de mucosa da traqueia e os gânglios do nervo trigêmeo macerados foram misturados com três volumes de iodeto de sódio 6M para lise celular e liberação do DNA total. O DNA foi subsequentemente recuperado em microesferas de dióxido de silício, como descrito anteriormente por Vogelstein e Gillespie (1979) e Boom *et al.* (1990).

Os oligonucleotídeos utilizados foram o ICP4-1F (5'- CCTTGGTTCGGGAT-GAAACC-3') e ICP4-1R (5'- TTCATTACCTCCAGCGGTTCC-3') (Preis *et al.*, 2013). Os

componentes da PCR constituíram uma solução de 25 µl (PCR Master Mix, Promega, Madison, WI, USA) adicionando 2 µl (200 ng) do DNA total obtido na extração. O controle positivo foi obtido de amostras de VLTi positivas de amostras de traqueia de campo que foram previamente confirmadas por sequenciamento (Couto, 2014) e como controle negativo foram utilizados os oligonucleotídeos juntamente com o PCR Master Mix e água ultrapura livre de nucleases. Os parâmetros de ciclos para amplificação foram: 94°C por 2 minutos, seguido de 40 ciclos de 94°C por 30 segundos, 54°C por 30 segundos e 72°C por 2 minutos e para extensão final 72°C por 15 minutos. O fragmento de DNA amplificado foi analisado pelo sistema de eletroforese em cuba horizontal em gel de agarose a 1,5% contendo 1X de tampão tris-borato-EDTA e 4µl de brometo de etídio a 120V por 45 minutos. A visualização dos fragmentos amplificados foi feita por transiluminação do gel em luz ultravioleta. O tamanho dos fragmentos amplificados foi comparado a um padrão de peso molecular (LowRanger 100bp DNA Ladder- Norgen®) disposto no gel juntamente com as amostras analisadas.

4.8 - Sequenciamento

O sequenciamento parcial do genoma do VLTi das aves foi realizado para a caracterização e filogenia do DNA viral obtido das aves deste estudo. A caracterização teve a finalidade de identificação de possíveis mutações ou a entrada de novas estirpes virais na região. Amostras com bandas fortemente positivas na PCR, com alta qualidade do DNA, baseado na proporção de 280/280 nm, de diferentes granjas e períodos foram selecionadas e encaminhadas para o sequenciamento. Foram selecionadas amostras coletadas por vigilância ativa da Granja E (dupla vacinação- verão de 2016), Granja F (uma vacinação- inverno de 2016), Granja F (uma vacinação – verão de 2017) e por vigilância passiva da Granja G (uma vacinação- verão de 2016) e da Granja B (dupla vacinação- inverno de 2018).

O sequenciamento genético foi realizado para os genes ICP4 e timidina quinase (TK), como realizado anteriormente por Couto (2014). Para a amplificação de dois fragmentos do gene ICP4, utilizou-se a metodologia descrita por Chacon e Ferreira, (2009), com modificações e para o gene TK foram utilizados os métodos descritos por Han e Kim (2001), com modificações (Couto et al., 2015).

Para o gene ICP4, a amplificação do primeiro fragmento foi realizada com o *primer reverse* (3R), o qual foi pareado com *primer forward* (3F), amplificando um produto de 923 pares de base. Para o segundo fragmento, o *primer reverse* (3R) foi pareado com o *primer forward* (2F), amplificando um produto de 747 pares de base. Os ciclos de temperatura utilizados

foram: 94°C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos 94°C por 1 minuto, 62°C por 1 minuto e 72°C por 1,5 minutos e uma extensão final de 72 °C por 10 minutos.

Os *primers* e condições da PCR para o gene TK foram os mesmos descritos por Han e Kim, (2001), sendo o *primer foward* pareado com *primer reverse* (TK-R), gerando um produto de 783 pares de base. Os ciclos de temperatura utilizados foram: 95°C por 1 minuto, seguido de 30 ciclos 94°C por 1 minuto, 54°C por 45 segundos e 72°C por 2 minutos e uma extensão final de 72 °C por 10 minutos.

O DNA amplificado foi analisado pelo sistema de eletroforese em cuba horizontal em gel de agarose a 1,5% contendo 1X de tampão tris-borato-EDTA e 4µl de brometo de etídio a 120V por 60 minutos. A visualização dos fragmentos amplificados foi feita por transiluminação do gel em luz ultravioleta. O tamanho dos fragmentos amplificados foi comparado a um padrão de peso molecular (LowRanger 100bp DNA Ladder- Norgen®) disposto no gel juntamente com as amostras analisadas.

Os produtos amplificados de DNA foram extraídos e purificados da agarose com um kit (Invisorb® Spin DNA *Extraction Kit*), conforme recomendações dadas pelo fabricante. Cada amostra foi sequenciada, nas direções *foward* e *reverse*, pelo método Sanger utilizando o Big Dye Terminator Mix V3.1 (Applied Biosystems®, EUA) com a reação de sequenciamento capilar ABI 3730 (Applied Biosystems®, USA).

As sequências obtidas tiveram sua qualidade avaliada pelo *Sequence Scanner*™ *Software 2* (Applied Biosystems, Foster City) e editadas no MEGA 7 (Kumar et al., 2016). Em seguida, as sequências obtidas e sequências disponíveis no *Gen Bank* foram alinhadas utilizando-se o MAFFT (Katoh *et al.*, 2005), Crustal W (Thompson *et al.*, 1994) e Bioedit Sequence Alignment software versão 7.2.5 (Hall, 1999). A análise filogenética foi feita com a utilização de sequências concatenadas de uma região do gene TK e duas regiões (1 e 2) do gene ICP4. A árvore filogenética também foi construída utilizando-se o MAFFT e *Geneious* utilizando-se o método de *Maximum Likelihood* com um total de 1000 replicações no *bootstrap*. A sequência da estirpe 63140/C/08/BR (JN542536) foi utilizada como referência para alinhamento dos nucleotídeos.

4. 9 - ELISA (Ensaio de imunoabsorção enzimática)

Foram amostradas 311 aves para o exame sorológico por ELISA. Estas aves foram amostradas também para histopatologia e para os testes moleculares individualmente. No inverno de 2016 foi realizada a coleta de sangue de 158 aves e no verão de 2017, de 153 aves.

Amostras de 3 ml de sangue total foram coletadas da veia ulnar ou por punção cardíaca, com agulhas e seringas plásticas estéreis individuais de 5 ml. Posteriormente, as amostras de sangue total foram armazenadas em tubos de coleta de 5 ml sem anticoagulante, refrigeradas em uma caixa de isopor e encaminhados no mesmo dia para o escritório do IMA-MG da cidade de Itamonte. O sangue total foi armazenado a -4°C por 24 horas e posteriormente foi centrifugado a 1000 g até que ocorresse a separação entre sangue e soro. O soro foi então transferido para um microtubo estéril de 1,5 ml e armazenado a -20°C. Em seguida, foram transportados em caixas de isopor contendo gelo, para o laboratório de patologia veterinária molecular da EV/UFGM e armazenados a -20°C até a realização do ELISA. A realização do ELISA indireto e leitura das placas ocorreu no Laboratório de Retrovíruses no Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da EV/UFGM.

As amostras de soros foram submetidas ao ELISA indireto utilizando um teste comercial denominado *ILTV Antibody Test Kit* (CK124 ILT Biochek®, Holanda) e a metodologia foi realizada conforme instruções do fabricante.

Foi utilizado um total de 4 placas de 96 poços, onde as amostras foram diluídas individualmente em um diluente, fornecido pelo kit, na concentração de 1:500. Em cada placa, nos poços A1 e B1 foram adicionados 100 µl de solução de diluição, nos poços C1 e D1 foram adicionados 100 µl do controle negativo e nos poços E1 e F1 foram adicionados 100 µl de controle positivo, todos fornecidos pelo kit. Assim, 100 µl das amostras diluídas foram adicionadas em seus poços específicos (contendo o antígeno aderido a estes) e incubados em temperatura ambiente (22-27°C) por 60 minutos cobrindo-se a placa com uma tampa. Após a incubação, os conteúdos da placa foram removidos e submetido a 5 lavagens, com 200 µl do tampão de lavagem por poço e por lavagem. Após a lavagem, 100 µl do reagente conjugado fornecido pelo kit foi adicionado em todos os poços e incubado em temperatura ambiente (22-27°C) por 60 minutos cobrindo-se a placa com uma tampa. Em seguida o conteúdo foi descartado e submetido a 5 lavagens, com 200 µl do tampão de lavagem por poço e por lavagem. Em seguida, 100 µl do substrato reagente foi adicionado em cada poço da placa e incubado em temperatura ambiente (22-27°C) por 30 minutos, protegendo os reagentes da luz com uma tampa. Após este período, 100 µl da solução de parada foi adicionado em cada poço para o fim da reação. Em seguida, a placa foi submetida a leitura na Leitora de microplaca TP-READER da Thermo Plate® e a intensidade da cor produzida pelo teste de ELISA foi medida fotometricamente em um comprimento de onda de 405 nm.

Os resultados obtidos na leitura foram compilados no Biochek II Diagnostic software® onde foram gerados relatórios com a titulação das amostras.

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

Para análise estatística foi utilizado o programa SAS 9.4®. Foi realizada análise de qui-quadrado para comparação de proporções de animais positivos e negativos entre as diferentes classes de efeitos estudados. Para conhecer as variáveis importantes para explicar a mudança das chances de os animais serem infectados, foi realizada análise de regressão logística com procedimento *stepwise* de seleção de variáveis. O erro tipo I considerado em todas as análises foi de 5%.

Na análise estatística referente aos resultados do PCR da traqueia e gânglio do nervo trigêmeo, foram avaliadas 941 aves, desconsiderando os lotes que possuíam 6 aves ou menos.

6. RESULTADOS

Durante o período de quatro anos de estudo, um total de 1.284 aves, provenientes das coletas programadas (vigilância ativa) e das coletadas por notificação (vigilância passiva), foram examinadas para a presença do VLTI e/ou para lesões compatíveis ou consistentes com a LTI.

6.1 – Sinais clínicos e macroscopia

Das 963 aves amostradas durante as coletas programadas, 118 apresentaram sinais clínicos identificados na avaliação realizada antes da eutanásia ou apenas foram detectadas lesões no exame macroscópico durante a necropsia. Destas, 76 apresentaram sinais clínicos ou lesões macroscópicas envolvendo o sistema respiratório. Estas lesões variaram desde alterações leves e restritas ao sistema respiratório ou moderadas a acentuadas com o envolvimento de outros órgãos. Cinco destas aves apresentaram secreção nasal discreta a moderada.

Os resultados referentes aos achados macroscópicos podem ser observados na figura 5. Dentre as 76 aves, seis apresentavam sinais clínicos de dificuldade respiratória acompanhada ou não de cianose. Das alterações macroscópicas encontradas, 27 aves estavam com hiperemia na mucosa da traqueia, variando de discreta a moderada. Em outras 23 aves havia aumento de volume dos seios nasais e paranasais (infraorbitários), unilateral e/ou bilateral, discreto a

acentuado. Em dezoito aves havia aerossaculite, focal a multifocal, discreta a moderada e com ausência ou presença de material amarelado de aspecto caseoso aderido a este. Muco na traqueia em quantidade discreta a moderada foi visualizada em dezoito aves. Em quatro aves adicionais foi diagnosticada pneumonia unilateral focalmente extensa moderada a acentuada com ausência ou presença de material amarelado de aspecto caseoso. Quatro aves apresentaram conjuntivite moderada bilateral. Em outras três aves havia aumento acentuado da barbela, unilateral. Ao corte visualizou-se material amarelado de aspecto caseoso. Em outras duas aves constatou-se traqueíte fibrinosa moderada.

Em uma das coletas programadas (inverno de 2016), aves de duas granjas adicionais foram examinadas. Nestas granjas, as aves apresentaram sinais clínicos respiratórios, aumento da mortalidade e havia a suspeita de LTI. Entretanto, apesar dos sinais clínicos sugestivos de LTI, as lesões foram consistentes com aerossaculite e broncopneumonia necrocáseosa compatíveis com colibacilose (Figura 6).

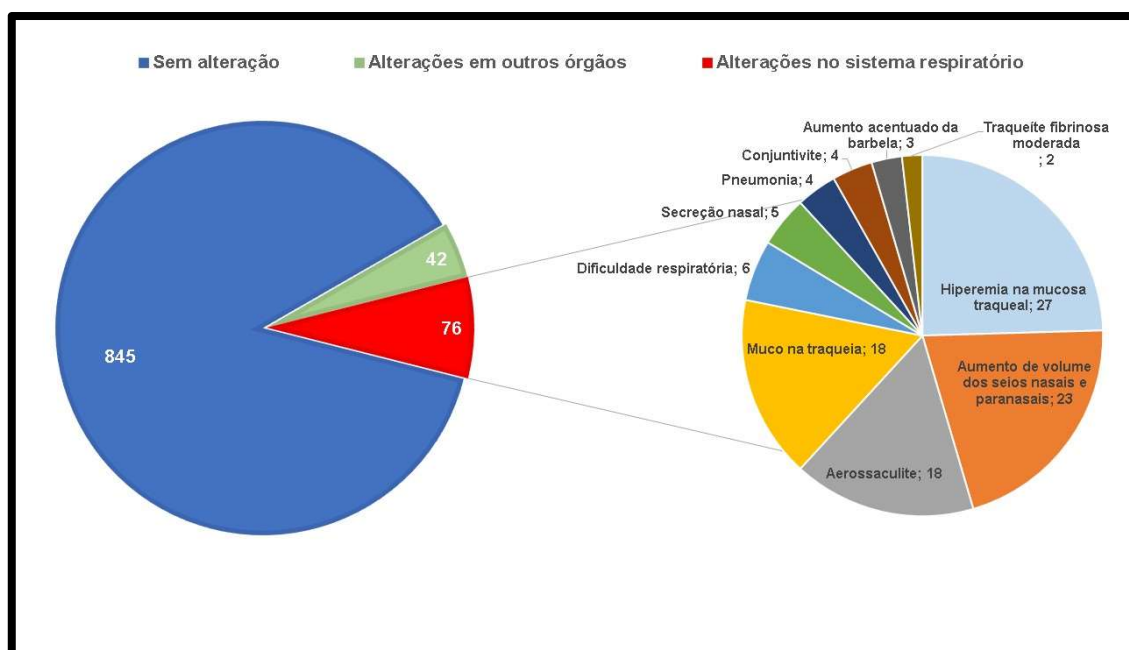


Figura 5: Achados clínicos e macroscópicos das aves amostradas durante a vigilância ativa.

6.2 - Histopatologia:

Foram examinadas no total 2.240 cortes de tecidos respiratórios provenientes de 902 aves amostradas durante as coletas programadas e uma coleta anterior de setembro de 2013 (Tabela 4). Destas, 77 (8,53%) não apresentaram qualquer tipo de alteração nos três órgãos

examinados, tendo como escore zero. Em 630 (69,84%) aves havia alterações condizentes com resposta local a aplicação de vacinas tendo escores variando de 1 a 2. Das aves que apresentaram alterações patológicas condizentes com infecção por patógenos, em 174 (19,29%) foram encontradas lesões sugestivas de infecção por *Mycoplasma* spp., com escores de lesões variando de 1 a 3. Em quinze aves (1,6%) foram encontradas diferentes lesões. Destas, seis aves (0,66%) tiveram diagnóstico histopatológico condizentes com coriza infecciosa, causada por *Avibacterium paragallinarum*, com escores de lesões entre 2 e 3. Em três (0,4%) aves, as lesões eram de pneumonia granulomatosa, com escores variando de 1 a 2, sugestivas de infecção bacteriana. Em duas (0,22%) aves as lesões foram sugestivas de colibacilose, infecção causada por *Escherichia coli* patogênica para aves (APEC), com lesões de escore 2. Em uma ave (0,11%) havia lesões sugestivas de infecção por bronquite infecciosa das galinhas, causada por *Gammacoronavirus*, o vírus da bronquite infecciosa das galinhas, com escore de lesão 3. Somente em seis (0,66%) aves provenientes das coletas programadas (vigilância ativa) foram encontradas lesões consistentes com LTI, com escore de lesões variando entre 2 e 4.

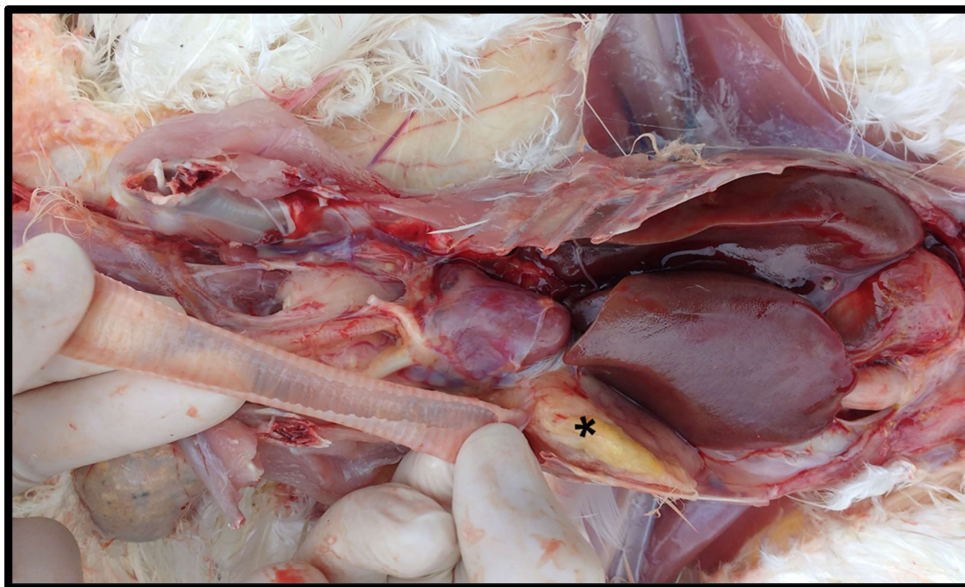


Figura 6. Galinha poedeira com sinais clínicos respiratórios similares a LTI, coletada por vigilância ativa, sem lesões macroscópicas na traqueia e com aerossaculite caseosa (*).

Tabela 4: Resultados da avaliação histopatológica relacionando o período da coleta com o diagnóstico, o número de aves e o escore da lesão.

Coleta	Verão 2013	Inverno 2014	Verão 2015	Inverno 2015	Verão 2016	Inverno 2016	Verão 2017	Total
	aves (escore)	aves (escore)	aves (escore)	aves (escore)	aves (escore)	aves (escore)	aves (escore)	
Diagnóstico histopatológico								
Laringotraqueíte infecciosa	1(3)	0	0	1(4)	0	1(3) 2(4)	1(4)	
	1			1		3	1	6
Micoplasmose	2(1)	11(1)	7(2)	4(1)	3(1)	3(1)	6(2)	
	2(2)	18(2)	5(3)	14(2)	14(2)	18(2)	18(3)	
	5(3)	9(3)		22(3)	5(3)	8(3)		
	9	38	12	40	22	29	24	174
Resposta vacinal								
	37(1)	112(1)	122(1)	84(1)	75(1)	90(1)	88(1)	
	1(2)		2(2)	7(2)	2(2)	5(2)	5(2)	
	38	112	124	91	77	95	93	630
Sem alteração	0	11(0)	8(0)	15(0)	7(0)	16(0)	20(0)	
		11	8	15	7	16	20	77
Outras lesões	0	1(1) 1(2)	1(2) 1(3)	0	0	3(1) 7(2)	1(1)	
		2	2			10	1	15
Total	48	163	146	147	106	153	139	902

6.3 - Resultados da PCR:

Das 963 aves amostradas durante as coletas programadas (vigilância ativa), foi realizada PCR do gene ICP4 para a detecção do GaHV-1 nas traqueias e gânglios dos nervos trigêmeos (GTs) de todas as aves (Anexo 4). No total, 278 (28,86%) aves foram positivas para a detecção do VLTi na traqueia, GTs ou em ambos. Para a traqueia, 184 (80,55%) aves foram positivas. Dos resultados referentes aos GTs, 127 (13,50%) aves foram positivas. Destas, apenas 33 aves, ou seja, 3,33% resultaram positivas em ambas PCRs. A proporção de aves positivas entre os PCRs de GTs e traqueia foram diferentes de acordo com o teste de qui-quadrado ($p=0,04$). Pelo coeficiente de concordância *Kappa de Cohen*, quando avaliados para os dois tecidos, foi igual a 0,06, ou seja, a concordância entre os resultados dos exames é fraca, não mostrando associação entre estes tecidos. O banco de dados, referente as coletas programadas, se encontra no Anexo 4.

6.3.1 - Resultados da PCR para o VLTi por coleta:

Em relação a primeira coleta, realizada no inverno de 2014, foram amostradas 172 aves, onde 97 (56,39%) foram positivas para a detecção do VLTi na traqueia, GTs ou em ambos. Para a traqueia, 50 (29,06%) aves foram positivas, para os GTs 67 (38,95%) foram positivas, e 20 (11,62%) aves foram positivas em ambos.

A partir da segunda coleta houve uma queda acentuada no número de aves positivas. No verão de 2015 foram amostradas 153 aves. Destas, 44 (28,75%) foram positivas para a detecção do VLTi na traqueia, GTs ou em ambos. Para a traqueia, 25 (16,33%) aves foram positivas e igualmente, 25 (16,33%) foram positivas no GT, e seis (3,92%) em ambos.

No inverno de 2015 houve continuação na queda do número de aves positivas de maneira menos intensa. Da amostragem de 150 galinhas, 32 (21,33%) foram positivas para a detecção do VLTi na traqueia, GTs ou em ambos. PCR da traqueia resultou positiva em 24 (16%) aves e em 11 (7,33%) para os GTs. Positividade para ambos os tecidos foi detectada em três (2%) aves.

O menor número de aves positivas ocorreu no verão de 2016. Um total de 147 aves foram amostradas, onde 28 (19,04%) foram positivas para a detecção do VLTi na traqueia, GTs

ou em ambos. Para a traqueia, 19 (12,92%) aves foram positivas, para os GTs, somente 12 (8,16%) foram positivas. Positividade para ambos os tecidos foi obtida em três (2,08%) aves.

No inverno de 2016, foram amostradas 185 aves. A quantidade de aves positivas para o VLTI foi próxima a coleta anterior. No total, 38 (20,54%) foram positivas para a detecção do VLTI na traqueia, GTs ou em ambos. Para a traqueia, positividade foi detectada em 28 (15,3%) aves. Para os GTs, 11 (5,94%) foram positivos, e uma ave (0,54%) resultou positiva para ambos.

Na última coleta, no verão de 2017, houve a amostragem de 156 aves. No total, 39 (25%) foram positivas para a detecção do VLTI na traqueia, GT ou em ambos. Para a traqueia, 38 (24,03%) aves foram positivas, para os GTs uma ave (0,64%) foi positiva, e nenhuma ave foi positiva nos dois tecidos.

Considerando os três ciclos de coleta (cada ciclo um inverno e um verão), no primeiro ciclo foi obtida maior proporção de aves positivas (43,38%). Quando avaliados os resultados dos exames por ano, 2014 a 2017, a proporção de indivíduos positivos e negativos foram diferentes entre os anos ($p < 0,0001$). Maior proporção de aves positivas, quando somados os resultados de ambos exames, foi obtida no ano de 2014, com 56,40% das aves positivas e a menor proporção foi obtida em 2016, com 20,38% de aves positivas. Contudo, foi possível identificar um declínio na proporção de aves positivas, considerando o momento em que todas as aves estavam vacinadas, e o retorno do aumento na proporção de aves positivas a partir do inverno de 2016, quando se encontravam nas granjas aves sem a dupla vacinação (Figura 7).

6.3.2 - Resultados da PCR para o VLTI por granja:

Diferença estatística foi constatada na proporção de animais positivos e negativos entre granjas ($p = 0,001$). A granja G, que apesar de não ser uma das granjas com maior proximidade das demais, está localizada ao lado de uma estrada com tráfego intenso de caminhões que prestam serviço a outras granjas da região. Essa granja possui uma população de 370 mil aves em 17 núcleos, se localizando a 850 m da granja mais próxima e a 300 m de uma rodovia, com cerca viva parcial de seus galpões e apresentou maior porcentagem de aves infectadas. Foram identificadas 35,19% (38/108) aves positivas para o VLTI. A granja com menor frequência para a detecção do DNA viral foi a granja D. Esta granja localiza-se em uma área geográfica mais distante das demais, utiliza aves provenientes da linhagem Bovans que demonstram um temperamento mais dócil, possuindo a terceira menor população entre as granjas analisadas.

Esta granja tem uma população de 199.000 aves em 10 galpões, com o maior isolamento dentre as granjas (1000 m) e cerca viva em todo o perímetro da granja. Nesta, 17/110 (15,45%) aves de todas as coletas somadas, estavam infectadas.

6.3.3 - Resultados da PCR para o VLTI por estação:

A estação do ano, inverno ou verão, apresentou associação com a proporção de aves positivas e negativas ($p=0,041$). Maior proporção de aves infectadas foi obtida no inverno. Do total de 507 aves amostradas no inverno, 167 (32,93%) estavam infectadas. Das 456 aves amostradas durante os meses de verão, 111 (24,34%) estavam infectadas pelo VLTI.

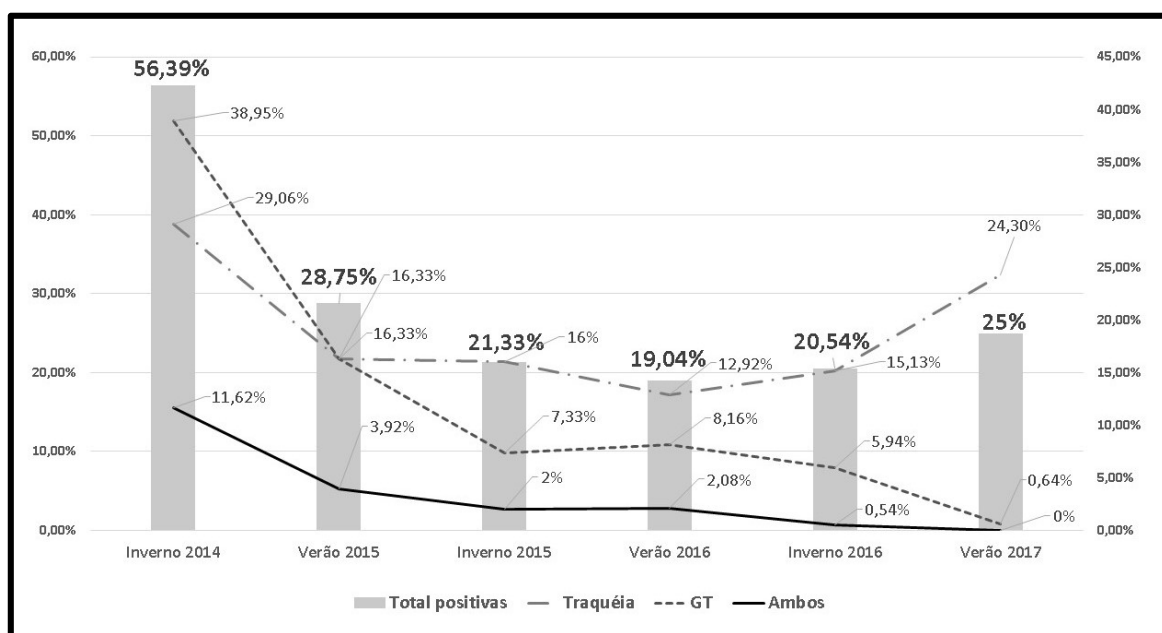


Figura 7: Resultados da detecção (em porcentagem) do DNA do VLTI das aves em amostras de traquéia, de gânglios dos nervos trigêmeos ou em ambos de todas as aves examinadas por coleta.

6.3.4 - Resultados da PCR para o VLTI por vacinação:

Relacionado ao tipo de vacinação, um total de 171 aves, correspondentes a duas granjas, não foram vacinadas para o controle de LTI, estas foram coletadas inicialmente para comparação. No entanto, uma destas granjas foi desativada após a segunda coleta,

permanecendo assim a granja H que possui somente três galpões e se encontra mais isolada em relação as demais granjas. Para estas granjas não vacinadas contra LTI, 56 (32,75%) aves foram positivas para o VLTI. Quatrocentos e dezessete aves receberam vacinação única com HVT-LT, onde 130 (31,18%) foram positivas. Duzentas e quarenta e oito aves foram vacinadas somente com FP-LT onde 57 (22,98%) foram positivas. Um total de 147 aves receberam vacinação dupla (HVT-LT e FP-LT), onde 45 (30,61%) foram positivas para o VLTI.

Utilizando o teste estatístico qui-quadrado, não foi identificada diferença na proporção total de aves positivas e negativas para o VLTI, quando comparadas aves que receberam os diferentes protocolos de vacinação (sem vacinação, vacinações únicas ou a vacinação dupla). No entanto, para o verão de 2017, quando feita a análise dentro de granjas, para as duas granjas (B e E) que utilizaram mais de um protocolo de vacinação no período de estudo, a proporção de aves positivas e negativas foi diferente entre os protocolos ($p=0,04$). Foi obtida menor proporção de positividade (5%) para aquelas aves que receberam vacinação dupla.

6.3.5 - Resultados da PCR para o VLTI por linhagem:

Das aves analisadas, foram identificadas seis linhagens distintas, Bovans ($n=119$) com 22 (18,49%) aves positivas, Dekalb ($n=122$) com 34 (27,87%) aves positivas, Hisex ($n=161$) com 40 (24,84%) aves positivas, Hyline ($n=453$) com 167 (33,74%) aves positivas, Isa Brown ($n=19$) com 3 (15,79%) aves positivas e Loman ($n=67$) com 22 (32,84%) aves positivas.

A proporção de infecção de aves de diferentes linhagens foi significativamente diferente ($p=0,0049$), sendo a linhagem Hyline a que apresentou a maior proporção de aves infectadas (33,74%).

As categorias de idades das aves (recria, pico de postura e final da postura) não estão associadas com a infecção pelo VLTI ($p=0,2050$), ou seja, não houve diferença estatística ao comparar aves positivas e as diferentes idades.

6.4 – Resultados do sequenciamento dos genes ICP4 e TK

Para o sequenciamento das duas regiões de gene ICP4 e TK, cinco amostras foram selecionadas e sequenciadas, com a recuperação dos produtos obtidos demonstrados na tabela

5. As amostras foram selecionadas tendo como critérios as granjas (vacinação dupla, única e não vacinada), as estações, o ano e a qualidade do DNA para possibilitar o sequenciamento.

Todas as seqüências foram classificadas como estirpes do VLTi virulentas brasileiras, com base na análise filogenética de seqüências concatenadas de regiões selecionadas do genoma da VLTi. Uma região continha seqüência do gene TK e as outras duas regiões continham seqüências do gene ICP4 (Figura 8). As análises filogenéticas agruparam as quatro amostras (Brazil virulent MG/FarmE-P871/Summer/2016, Brazil virulent -MG/FarmG-P982/Summer/2016, Brazil virulent -MG/FarmF-P1253/Winter/2016, and Brazil virulent -MG/FarmF-P1369/Summer/2017) com a mesma estirpe caracterizada anteriormente, em 2011 (KF786297.1, KF786292.1 e KF786287.1). A sequência Brazil virulent -MG/FarmB-H1096/Winter/2018, foi discretamente diferente com três polimorfismos de nucleotídeo único nas posições 3.854 (119,133), 3.937 (119,216), e 4.020 (119,299) no gene ICP4 (genoma completo). Seqüências de 2016 e 2017 possuíam as bases G, A e C, enquanto a seqüência de 2018 possuía A, C e T nas posições descritas anteriormente.

Quando comparado as estirpes virulentas de campo da área estudada com as estirpes provenientes do estado de São Paulo, detectadas em 2004 (FJ477366 e FJ477367), assim como o isolado de 2018, estas estirpes também possuem as bases A e C nas posições 3.854 e 3.937, como descrito previamente, similar a seqüência Brazil virulent -MG/FarmB-H1096/Winter/2018. Porém, as sequencias FJ477366 e FJ477367, também possuem C na posição 4.020 (119,299) como as demais sequencias do gene ICP4. A comparação entre as amostras provenientes de Minas Gerais e as de São Paulo revelam uma relação genética próxima entre estas.

Tabela 5: Amostras sequenciadas e tamanho dos produtos obtidos

Amostra	Data de coleta	Granja	Tipo de coleta	ICP4 - 747pb	ICP4 – 923pb	TK – 783pb
P871	02/2016	E	Vigilância ativa	622pb	782pb	700pb
P982	02/2016	G	Vigilância ativa	630pb	825pb	683pb
P1253	10/2016	F	Vigilância passiva	634pb	773pb	694pb
P1369	02/2017	F	Vigilância ativa	633pb	809pb	667pb
H1096	09/2018	B	Vigilância passiva	633pb	780pb	656pb

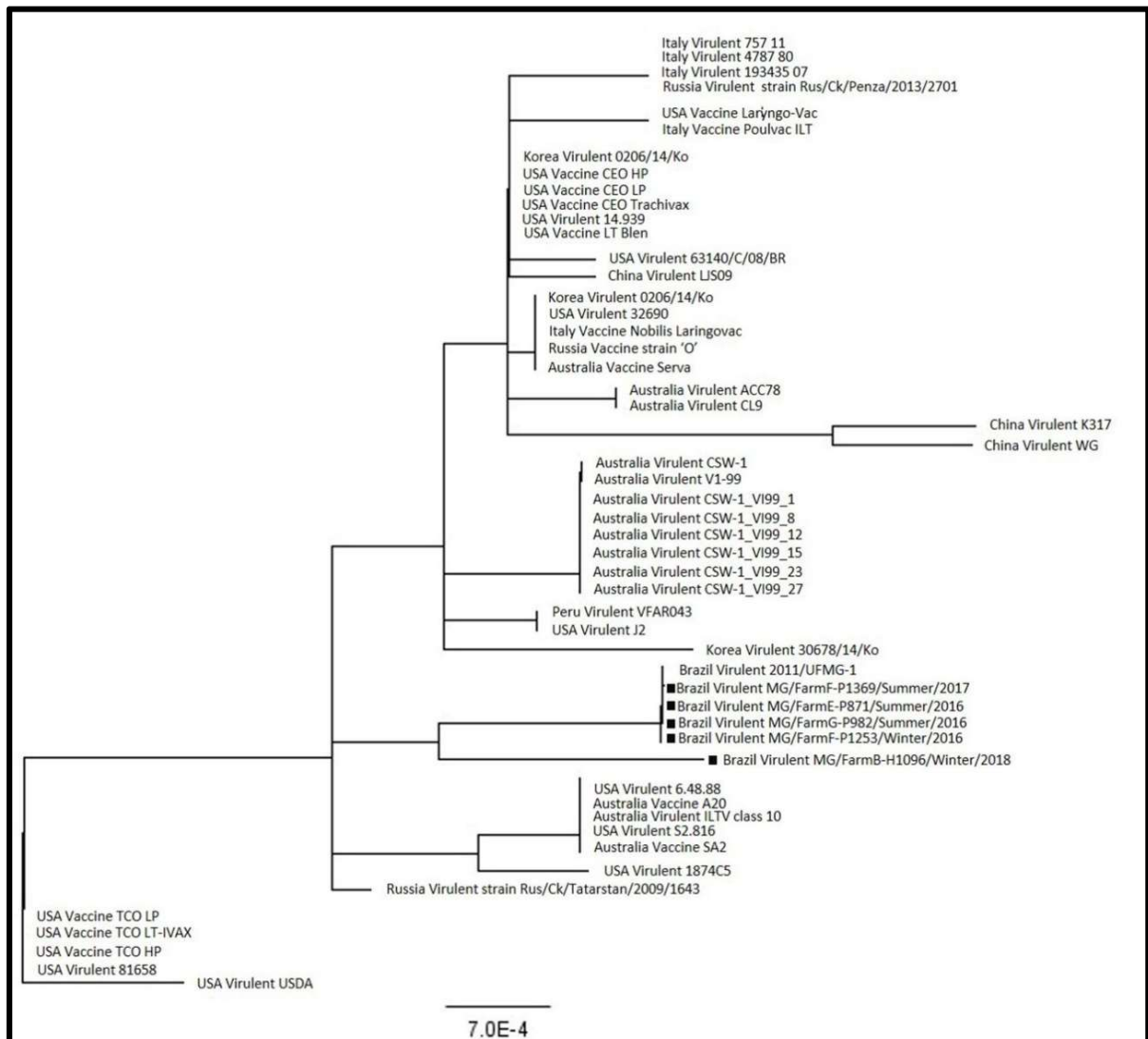


Figura 8 – Dendograma baseado nas sequências dos genes TK e ICP4 concatenados. Ramos referentes as sequências desse estudo foram identificadas com o símbolo ■ (quadrado).

6.5 - Resultado da sorologia (ELISA) para o VLTI:

Foram analisados os soros de 311 aves provenientes das duas últimas coletas. Destas, sorologia positiva para a exposição ao VLTI foi obtida de 173 aves (55,62%). Dos soros provenientes de 311 aves, 158 foram amostradas no inverno de 2016 e 79 (50%) destas foram sorologicamente positivas. No verão de 2017, 153 aves foram amostradas para sorologia, onde 93 (60,78%) destas foram positivas para anticorpos contra o GaHV-1. Trinta e sete aves não eram vacinadas, destas, 14 (37,83%) foram positivas. Cento e setenta e nove aves foram vacinadas somente com HVT-LT e destas, 76,57% foram sorologicamente positivas. Setenta e nove aves foram vacinadas somente com FPV-LT, onde 20,25% eram positivas (Tabela 6).

Na diluição de 1/500 as aves consideradas negativas apresentaram em média a titulação de 468,047 (razão S/P média de 0,232). Os valores de titulação variaram de 675,8 (razão S/P de 0,005) a 1.054,706 (razão S/P de 0,493). Nas aves consideradas positivas, a média das titulações foi de 3.300,463 (razão S/P média de 1,373). Os valores de titulação variaram de 1.071,191 (razão S/P de 0,5) a 10.547,427 (razão S/P de 3,999), ocorrendo uma dispersão sorológica semelhante em todas as diferentes idades amostradas (Figura 9). Destas 311 aves sorologicamente testadas, uma ave foi positiva na avaliação histopatológica, PCR da traqueia e sorologia. Quarenta e uma aves foram positivas tanto na sorologia quanto na PCR, com ausência de lesões histológicas. Em 185 aves foram obtidos resultados positivos pelo ELISA ou pela PCR, na ausência de lesões histológicas. Oitenta e quatro aves foram negativas em todos os três testes.

Em relação a idade das aves testadas por ELISA (Figura 9) para anticorpos anti-VLTI, não foi observada diferença estatística quando as diferentes idades foram comparadas em relação ao resultado sorológico positivo.

Tabela 6: Resultados dos valores sorológicos detectados em aves que receberam protocolos de vacinação diferentes.

Protocolo vacinal	Titulação média	Variação da titulação	Aves positivas	Total de aves
Não vacinada	979,746	6,758 a 3057,69	14 (37,83%)	37
HVT - LT	2833,471	11,334 a 10547,427	134 (76,57%)	175
FPV - LT	979,158	17,830 a 9268,260	16(20,25%)	79
Dupla vacinação	1196,735	304,647 a 3491,560	9 (45%)	20

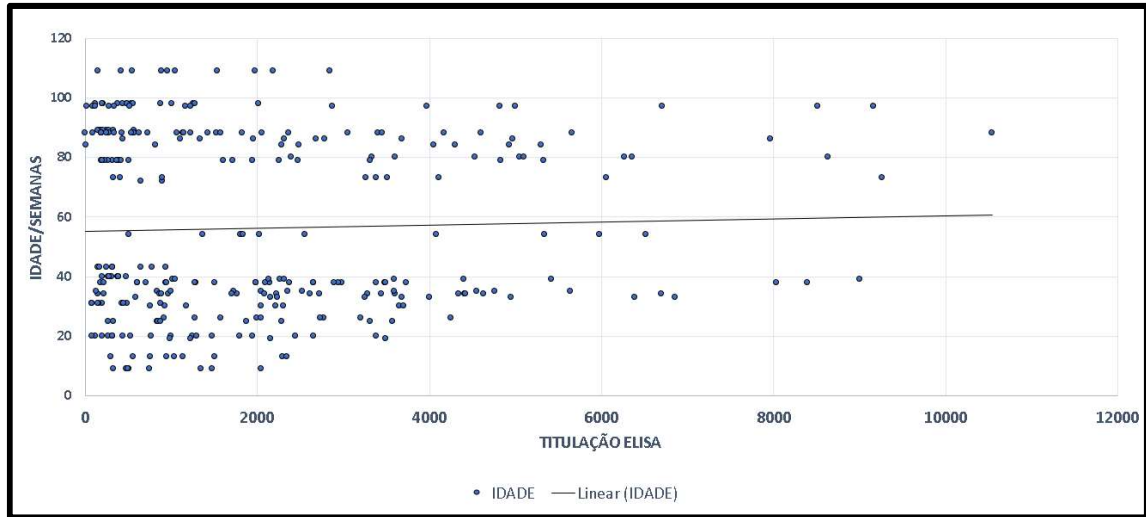


Figura 9: Valores da titulação de anticorpos detectados em aves com diferentes idades. Os soros considerados positivos foram os com titulação superior a 1.071 na diluição de 1/500.

6.6 – Resultados gerais referentes às análises sorológicas, PCR e por histopatologia das coletas por vigilância ativa em aves que receberam protocolos de vacinação diferentes:

O maior número de aves positivas para o VLTI foi por sorologia, seguido da PCR da traqueia, PCR dos GTs e por fim histopatologia. Relacionado ao tipo de protocolo vacinal, houve variação entre protocolos onde aves não vacinadas e vacinadas com HVT-LT apresentaram maior porcentagem de aves positivas (Tabela 7).

Tabela 7: Resultados em números absolutos e porcentagem de aves positivas em diferentes métodos de diagnóstico e com diferentes protocolos vacinais.

Protocolo vacinal	PCR		ELISA	Histopatologia
	Traqueia	GT		
Não vacinadas	38/180(21,11%)	29/180(16,11%)	14 /37(37,83%)	1 /158(0,63%)
HVT - LT	96/429 (22,37%)	42/417(10,07%)	134 /175(76,57%)	4/374(1,06%)
FP-LT	40/265 (15,09%)	32/265(12,07%)	16/79(20,25%)	0/234(0%)
Ambas Vacinas	29/172 (16,86%)	24/172(13,95%)	9/20(45%)	1/163(0,61%)
Total	203/1046(19,4%)	127/1004(12,64%)	173/311(55,62%)	6 /929(0,64%)

6.7 - Resultados das aves amostradas por vigilância passiva:

Tecidos respiratórios e conjuntivas de um total de 321 aves foram encaminhadas pelos veterinários do IMA ao Setor de Patologia Veterinária da UFMG para o diagnóstico histopatológico. Nestas amostragens, as aves de um ou mais lotes apresentaram sinais de doença respiratória aguda. A taxa de mortalidade para estes lotes variou de 1,2% a 17,4 %. Das doenças respiratórias, em 124 (38,62%) aves foi realizado diagnóstico compatível ou conclusivo de LTI (Figuras 10 A, B e C). Destas, as lesões macroscópicas de laringotraqueíte fibrinonecrótica sugestivas de LTI foram frequentes. Esta foi confirmada pela histopatologia incluindo casos de conjuntivite fibrinonecrótica com células sinciciais e corpúsculo de inclusão intranuclear (Figura 11A). Lesões macroscópicas de laringite fibrinonecrótica e obliterativa focalmente extensa (Figura 11 B e C) foi caracterizada pela histopatologia como boubia aviária. Outras doenças respiratórias também foram diagnosticadas por histopatologia nas demais aves, bronquite infecciosa aviária, coriza infecciosa, micoplasmose e pasteurelose. Também foram identificadas aves com alterações condizentes com resposta a administração de vacinas e aves com traqueíte crônica com regeneração do epitélio respiratório, onde não foi possível formular um diagnóstico histopatológico com indicação da etiologia (Tabela 8 e Figura 12). Essas amostragens compreenderam o período de 2017 a 2018. Nos anos anteriores (2013 a maio de 2016) não foi constatada ocorrência de LTI por meio da vigilância ativa e passiva.

Tabela 8: Número de aves examinadas e diagnóstico por ano pela vigilância passiva

Ano	Bouba diftérica	Bronquite infecciosa	Coriza infecciosa	Laringotraqueíte infecciosa aviária	Micoplasmose	Pasteurelose	Resposta a administração de vacinas	Traqueíte crônica/regeneração	Total
2016	13	17	9	53	-	1	5	5	103
2017	2	8	-	20	45	-	40	-	115
2018	1	-	-	51(7*)	39	-	12	-	103
Total Geral	16	25	9	124	84	1	57	5	321

*aves com lesão simultânea por LTI e micoplasmose

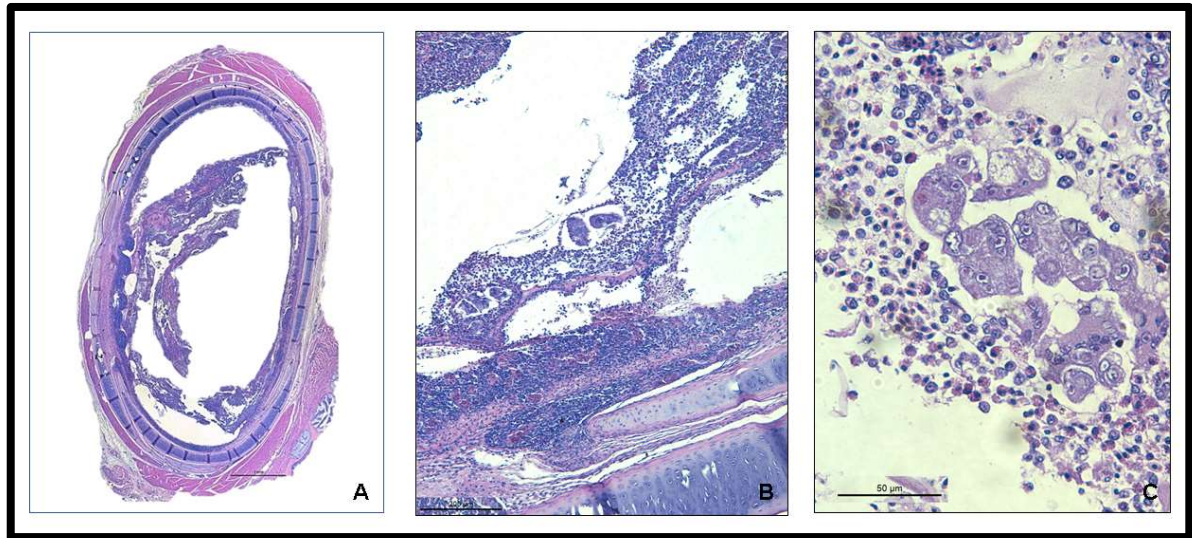


Figura 10. Galinha de postura. A: Laringite fibrinonecrótica circunferencial acentuada. B e C. Maior aumento da imagem C destacando necrose com descamação de células sinciciais contendo corpúsculos de inclusão intranucleares. Hematoxilina e eosina. 10x (C), 200x (D), 400x (E).

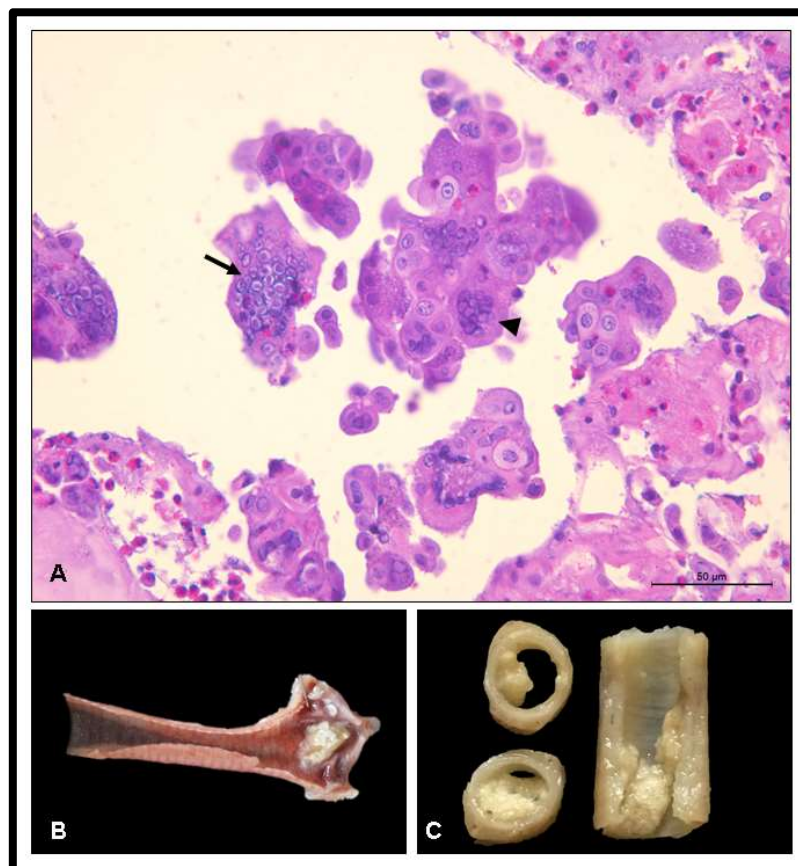


Figura 11. A: Conjuntivite fibrinonecrótica e heterofílica acentuada com células sinciciais contendo corpúsculos de inclusão intranucleares do tipo Cowdry A (seta) e Cowdry B (ponta de seta). Hematoxilina e eosina. 400x. B: Bouba diftérica. Laringe e traqueia de galinha poedeira coletada por vigilância passiva. Traqueíte com exsudato fibrinonecrótico abundante obstruindo o lúmen na região da laringe. C: Traqueia fixada em formalina 10% coletada por vigilância passiva. Traqueíte fibrinonecrótica obliterativa acentuada.

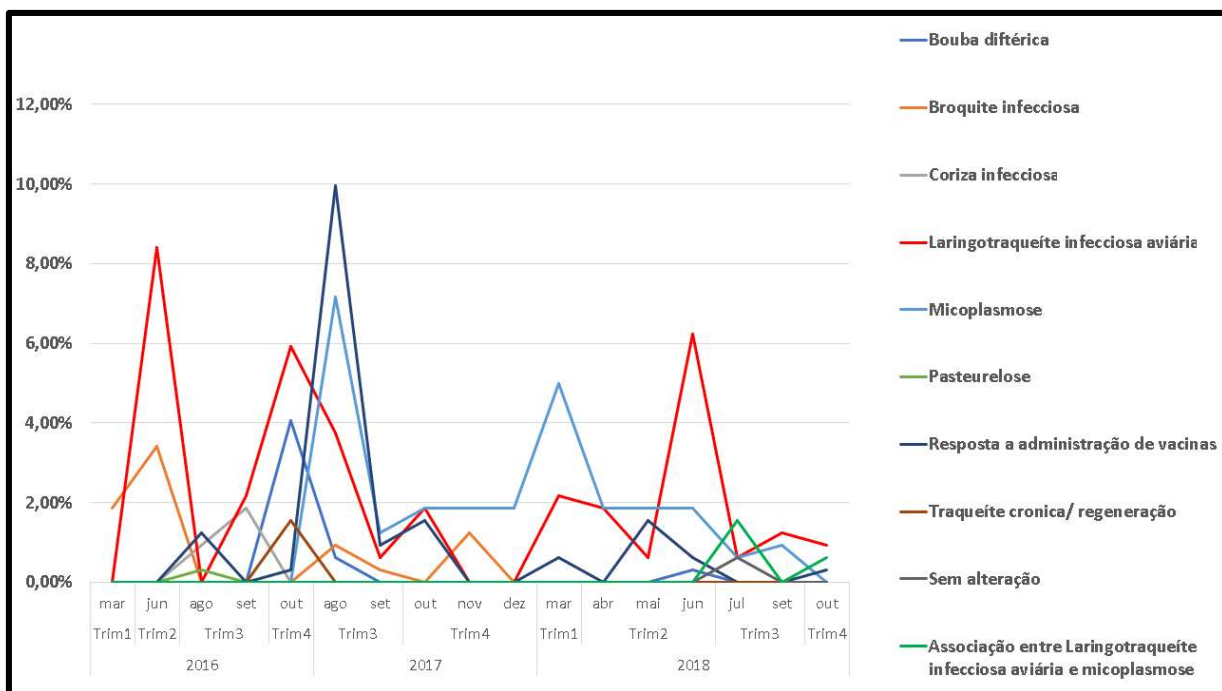


Figura 12: Doenças diagnosticadas por histopatologia em aves provenientes da vigilância passiva nos anos de 2016 a 2018.

6.8 Resultados proporcionais dos exames para detecção do VLTI e do exame histopatológico

Das 1.284 aves amostradas, 963 aves (amostradas por vigilância ativa) foram analisadas por meio da PCR para a detecção do GaHV-1 na traqueia e nos GTs. Em 278 (28,86%) aves, o DNA obtido foi amplificado gerando um produto com um fragmento de 237pb do gene diploide ICP4, responsável pela síntese da proteína reguladora da transcrição. A amplificação foi obtida de amostras da traqueia, GTs ou ambos. Nestas mesmas aves, foi realizada a histopatologia dos tecidos respiratórios e conjuntiva. Em seis (0,66%) aves foram constatadas lesões consistentes com LTI (células sinciciais e corpúsculo de inclusão intranuclear) e duas destas também foram positivas para o PCR da traqueia. Trezentas e onze (311/963) aves provenientes das duas últimas coletas por vigilância ativa, também foram pesquisadas quanto a presença de anticorpos contra o VLTI. Em 172 (55,3%) aves, títulos variáveis de anticorpos anti- VLTI foram detectados. Destas 311 aves, uma ave foi positiva na avaliação histopatológica, PCR da traqueia e sorologia, 41 aves foram positivas tanto na sorologia quanto na PCR, com ausência de lesões histológicas. Em 185 aves foram obtidos resultados positivos por ELISA ou PCR na ausência de lesões histológicas. Em duas das granjas cujas aves foram positivas na sorologia e na traqueia por PCR com ausência de lesões, surtos de LTI não são diagnosticados desde 2012. Oitenta e

quatro aves foram negativas em todos os testes. Das 321 aves enviadas pela vigilância passiva, 124 (38,62%) apresentaram lesões histológicas compatíveis ou consistentes com LTI (Tabela 9).

Tabela 9: Número de aves examinadas, tipo de exame e porcentagem de aves com diagnóstico positivo para o VLTI e/ou LTI.

	PCR Total	PCR Traquei a	PCR GTs	Sorolo gia - ELISA	Histopatologia (vigilância ativa)	Histopatologia (Vigilância passiva)
Total de aves	963	963	963	311	902	321
Porcentagem de aves positivas	28,86%	19,45%	13,5%	55,3%	0,66%	38,62%

Legenda: GTs= gânglios dos nervos trigêmeos

6.9 - Dados meteorológicos da região amostrada

As temperaturas médias registradas durante os períodos em que houve coleta das amostras, variaram entre 15°C - 20°C no inverno. As máximas foram próximas a 30°C e as mínimas atingindo 2°C. No verão, as temperaturas médias variaram entre 20°C - 25°C com as máximas próximas a 35°C e as mínimas próximas a 15°C (Figura 13).

Nota-se que não houve grandes variações entre as temperaturas médias, mínimas e máximas durante os períodos avaliados, tanto no verão quanto no inverno. Uma alteração meteorológica importante ocorreu no mês de junho de 2016, onde as temperaturas médias foram mais baixas (média entre 10-15°C) e as mínimas atingiram valores negativos. Coincidentemente, no mesmo período, houve piora na qualidade alimentar por escassez na oferta de milho de qualidade para a produção de ração para estas aves. Este período coincidiu com o ressurgimento dos surtos de doença respiratória.

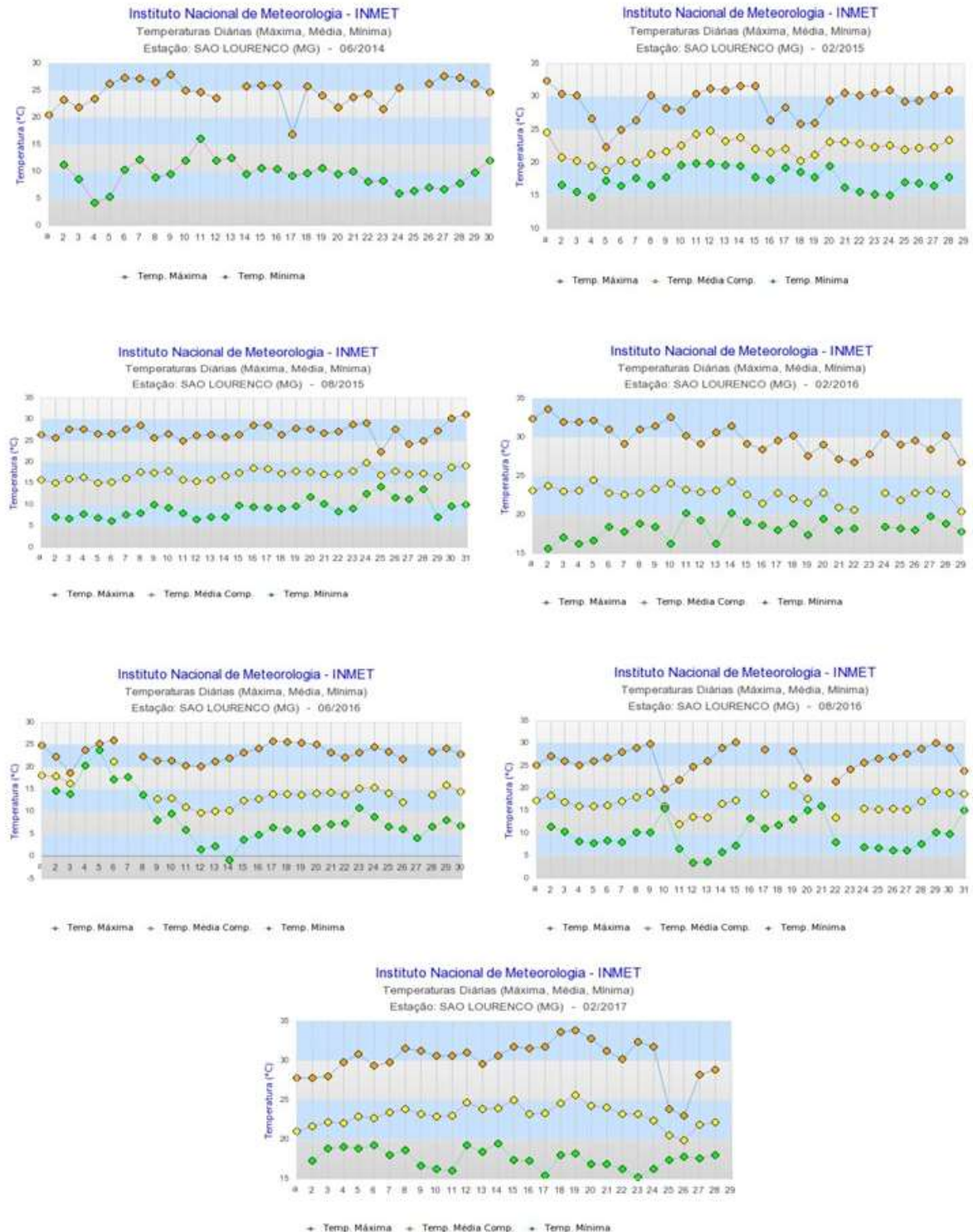


Figura 13: Variação de temperatura diária referente as datas de amostragens (06/2014 – 02/2017) e ao surto ocorrido em junho de 2016.

7. DISCUSSÃO

Os dados obtidos neste estudo indicaram que não houve efeito no uso de diferentes protocolos vacinais na porcentagem de aves infectadas pelo VLTI utilizando as vacinas recombinantes vetorizadas em uma análise geral, comparativamente entre as diferentes granjas. Entretanto, quando foi realizada a avaliação comparativa entre as aves da maior granja que fazia parte do estudo por vigilância ativa, foi observada menor positividade para o VLTI nas aves que receberam dupla vacinação (duas doses das vacinas recombinantes vetorizadas). Os fatores de risco inerentes a cada granja e os fatores de manejo e climáticos possivelmente interferem com a eficácia das vacinas no controle da doença. No inverno de 2016 ocorreram temperaturas mais baixas, problemas com a qualidade da ração, aumento na densidade de aves nas granjas e interrupção da dupla vacinação. Estes fatores e a possível entrada de uma nova estirpe viral, de maior patogenicidade nestas granjas, poderia justificar o ressurgimento de novos surtos clínicos de LTI. Além disso, nossos dados sugerem que o vírus continuou a evoluir após circular na área por alguns anos.

A LTI é uma doença com distribuição mundial, endêmica em países com alta densidade e concentração de granjas comerciais (Guy e García, 2008, Menendez *et al.* 2014), com ocorrências cíclicas de surtos (Guy e García, 2008). Usualmente o controle em zonas endêmicas é realizado com vacinas vivas atenuadas. No Brasil, atualmente, há duas regiões, de grande produção de ovos, interditadas devido a presença da LTI. Surtos de LTI em frangos de corte foram raros e os lotes foram eliminados quando ocorreu a notificação (MAPA, comunicação verbal). A região das Terras Altas da Mantiqueira em Minas Gerais, possui atualmente 24 granjas de postura com uma população total estimada superior a 10 milhões de aves, sendo o terceiro maior produtor de ovos no país (IBGE, 2017). De 2011 a 2018, somente o uso de vacinas recombinantes vetorizadas foi autorizado para o controle desta doença na região.

Até o momento, este é o primeiro estudo de longa duração, em condições de campo, avaliando o efeito do uso destas vacinas com diferentes protocolos vacinais, no controle da LTI. O início do presente estudo ocorreu quando as aves no início e no final da produção já estavam imunizadas com os protocolos vacinais estabelecidos em cada granja. As aves amostradas da região interditada apresentaram maior positividade na PCR para o VLTI na primeira coleta, quando ainda haviam nestas granjas, lotes de aves não vacinadas em final de produção, que sobreviveram a surtos anteriores de LTI. Houve um declínio significativo de positividade na segunda coleta (verão de 2015) e a positividade total foi decaindo até a quarta coleta (verão de

2016), com diminuição significativa na detecção de aves positivas. A diminuição da positividade em alguns períodos para o VLTI foi maior do que 50%. Considerando os três ciclos de coleta (cada ciclo um inverno e um verão), no primeiro ciclo foi observada maior proporção de aves positivas para o VLTI. Quando avaliados os resultados dos exames por ano, 2014 a 2017, a proporção de aves positivas e negativas foi diferente estatisticamente. Houve maior proporção de aves positivas no ano de 2014 e a menor proporção foi detectada no verão de 2016. Assim, ocorreu redução média de 35,86% de aves positivas em relação a 2013. Possivelmente, nesse período houve a influência dos protocolos vacinais utilizados pois todas as aves das granjas com vacinação estavam imunizadas contra o VLTI com as vacinas vetorizadas. Contudo, não devem ser desconsideradas as condições de conforto para as aves, influenciadas pelo manejo (modernização de galpões) e menores variações climáticas que foram verificadas nesse período. A vacinação juntamente com estes fatores pode ter influenciado a diminuição de surtos de LTI e a diminuição gradativa na proporção de aves infectadas. Entretanto, ocorreu o oposto quando houve aumento na densidade, mudança climática e alteração no protocolo de vacinação, quando as duas maiores granjas interromperam a vacinação dupla (HVT -LT e FPV-LT), ocorrendo somente a vacinação com HVT-LT entre o inverno de 2015 até o verão de 2017.

Apesar da alta frequência de aves positivas para o VLTI, a frequência da doença durante os primeiros dois anos e meio de estudo foi baixa. Surtos significativos de LTI não ocorreram entre os anos de 2013 (Couto, 2014) a junho de 2016. A partir de julho de 2016 até o final de 2018, surtos de doenças respiratórias tornaram a ocorrer nas maiores granjas amostradas, com frequência elevada. Os surtos apresentavam taxas de mortalidade acumulada variando de 0,2 a 5,4%. Estas taxas estão levemente acima das taxas sugestivas da forma epizootica leve, onde a taxa de mortalidade é menor que 5%. A taxa de mortalidade devido a LTI pode variar entre 10% - 20% (Seddon e Hart, 1935; Linares *et al.*, 1994; Bagust *et al.*, 2000). Os sinais para a forma leve incluem secreção nasal e estertores úmidos seguidos de tosse, respiração ofegante, depressão (Beach, 1926; Kernohan, 1931) conjuntivite hemorrágica, aumento dos seios infraorbitários e secreção nasal persistente, comumente causada por vírus vacinal que reverteu a virulência (Sellers *et al.*, 2004). Na forma grave, as aves apresentam lesões caracterizadas por traqueíte fibrino-hemorrágica acentuada com exsudato fibrinonecrotico denso obstruindo o lúmen da traqueia (Beach, 1926; Hinshaw *et al.*, 1931; Jordan, 1958; Seddon e Hart, 1935; Guy e Bagust, 2003). Os sinais clínicos e as lesões macroscópicas encontradas nas aves amostradas por vigilância ativa sugeriram a ocorrência de outras doenças respiratórias como a bronquite

infecciosa e a micoplasmose (Scholz *et al.*, 1994). Assim, o exame histopatológico indicou a ocorrência de outras doenças respiratórias na região e, quando somadas, se apresentam em maior proporção do que a LTI. Resultados diferentes foram obtidos para as aves examinadas e amostradas por vigilância passiva ou durante os surtos de doença respiratória, as quais apresentaram sinais e lesões da forma grave. Sinais clínicos e lesões encontradas nas aves amostradas por vigilância ativa e passiva sugerem a ocorrência de outras doenças respiratórias, tais como bronquite infecciosa e micoplasmose. A ocorrência de doenças causada por *Avibacterium paragallinarum*, *Avipoxvirus*, *Mycoplasma gallisepticum*, e *M. synoviae*, já foram relatadas na região (Couto *et al.*, 2015) e diagnosticadas isoladamente ou associadas a LTI. O exame histopatológico indicou a ocorrência de outras doenças respiratórias na região que ao serem somadas, foram mais frequentes que a LTI.

As alterações identificadas por sequenciamento e análise filogenética parcial do gene ICP4 e do gene TK, demonstraram que o VLTI de campo continua a circular na região, apesar das vacinações. As sequências do DNA viral obtidas por vigilância ativa foram semelhantes às sequências analisadas entre os anos de 2011 a 2013 (Couto *et al.*, 2015). No entanto, a sequência de DNA viral obtida de uma amostra de 2018 revelou um único polimorfismo não identificado nas amostras dos anos anteriores. Estes dados indicam que estirpes virulentas continuam a circular na região. Além disso, ocorreu evolução viral originando uma nova estirpe, provavelmente com maior patogenicidade, e possivelmente contribuindo assim com o ressurgimento de novos surtos de LTI na região.

Durante o período de estudo sobre o efeito do uso de vacinas recombinantes, não foram detectadas estirpes virais vacinais do tipo CEO e TCO, diminuindo assim as chances de possível reversão de virulência (Guy *et al.*, 1991), considerando o elevado número de aves negativas para o VLTI identificadas na região. Estirpes virais de origem vacinal são causadoras de surtos de LTI, relatada por diferentes estudos (Davison *et al.*, 2005; Oldoni e Garcia, 2007; Blacker *et al.* 2011).

Os resultados sorológicos com positividade de 50 a 60 % evidenciaram que as aves desenvolveram resposta humoral ao VLTI. A prevalência nestas aves é mais do que o dobro da prevalência encontrada em estudos com aves de produção em outros países como na Nigéria e em Bangladesh (Owoade *et al.*, 2005; Uddin *et al.*, 2014). No entanto, indica somente positividade na resposta do hospedeiro ao vírus. O teste utilizado não permite identificar diferenças na resposta humoral, ou seja, se os anticorpos formados são decorrentes da infecção natural ou vacinal. Os resultados também indicam que existem aves que não desenvolveram

resposta humoral. Um estudo realizado em galinhas de subsistência no Distrito Federal – Brasil (DF), demonstrou alta porcentagem de aves soropositivas (Tocantins, 2014), similar aos resultados do presente estudo. A prevalência de soropositividade ao VLTi nas aves de subsistência foi semelhante às aves de produção da região interditada de MG, cuja concentração de aves é imensa. Sendo assim, o uso concomitante do exame histopatológico apresenta fundamental importância na identificação de surtos de LTI, diferenciando assim a ocorrência da doença na região ou somente a presença do vírus em aves que apresentam infecção persistente ou subclínica. Deve-se ressaltar, também, a importância do uso de técnicas moleculares como o sequenciamento para a definição da origem e estirpe viral circulante em cada região. Na região estudada, há alta prevalência de infecção pelo VLTi, porém, a taxa de aves acometidas pela doença não acompanha esta proporção. Assim, em uma região endêmica, a PCR e o ELISA como testes únicos não são métodos diagnósticos confiáveis para a identificação de LTI e diferenciação de outros patógenos respiratórios pois, uma porcentagem elevada das aves se infecta com o VLTi, apresentando resultados positivos nestes testes. Contudo, a histopatologia possibilita realizar o diagnóstico diferencial da doença, pois na LTI há lesões patognomônicas (Guy *et al.*, 1992, Preis *et al.*, 2014 e Couto *et al.*, 2015). A sensibilidade do teste histopatológico aumenta consideravelmente com seleção criteriosa das aves (na fase aguda da doença) e se todos tecidos respiratórios e conjuntiva são coletados para exame, como constatado no presente estudo.

A detecção do DNA do VLTi com primers específicos para os genes ICP4 e TK em galinhas em uma região indica a presença de uma estirpe circulante. A análise filogenética mostrou que não havia identidade genética entre as estirpes locais e as estirpes vacinais (CEO ou TCO). Isso é tranquilizador considerando que a introdução de vacinas vivas não havia sido permitida na região durante todo o período de estudo. Embora, vacina vivas foram utilizadas em São Paulo. Com o intuito de evitar a detecção de genes vetorizados, os ensaios de PCR foram projetados para serem específicos para genes não incorporados nas constituições das vacinas vetorizadas. A FP-LT expressam os genes da gB e UL32 (Davison *et al.*, 2006; Johnson *et al.*, 2010; Coppo *et al.*, 2013) e a HVT-LT expressam os genes das glicoproteínas D e I (Gimeno *et al.*, 2011). Uma alta frequência de aves positivas, detectados por PCR, foi encontrada na área interditada, usualmente sem sinais clínicos da doença ou lesões histológicas, sugerindo latência e persistência das estirpes de campo do VLTi (Bagust, 1986; Williams *et al.*, 1992; Johnson *et al.*, 1995; Fuchs *et al.*, 2007). O VLTi pode ser reativado da latência no GT espontaneamente ou em condições de estresse (Bagust, 1986; Hughes *et al.*,

1989; Thilakarathne *et al.*, 2019). Neste estudo, o DNA do VLTÍ foi detectado no GT de galinhas por meio de PCR e, a porcentagem de amostras positivas variou anualmente e sazonalmente. O DNA viral foi detectado, não somente em aves com sinais clínicos, mas também em lotes que não apresentavam sinais clínicos da doença ou lesões histológicas compatíveis com LTI, sugerindo latência nessas aves. A persistência do VLTÍ na traqueia, pode ser relacionada a infecção em macrófagos. Macrófagos estão presentes na mucosa traqueal, como descrito por Krunkosky *et al.*, 2018. A susceptibilidade dos macrófagos a infecção pelo VLTÍ foi reproduzida por Calnek *et al.* em 1986. A persistência e reativação do *Alphaherpesvirus* bovino na tonsila de bezerros com infecção latente também já foi relatada (Winkler *et al.*, 2000).

A ausência de surtos da doença no período em que todas as aves estavam vacinadas pode ter sido influenciada pela resposta imune do hospedeiro contra a infecção pelo VLTÍ. Pode-se considerar que a dupla vacinação nas granjas e a menor influência de fatores de risco como os ambientais (frio) e menor densidade populacional (números de aves por gaiola e na região) tenham contribuído com a não ocorrência de surtos nesse período. Posteriormente, ocorreram simultaneamente, interrupção da dupla vacinação durante o ano de 2015, piora das condições climáticas na região, aumento da densidade populacional por granja e de piora na qualidade alimentar por escassez na oferta de milho de qualidade para a produção de ração para estas aves, além da detecção de uma possível nova estirpe viral. Assim, nesse período, possivelmente foram criadas situações de estresse nestas aves, diminuindo a imunidade e consequentemente ocorrendo nova replicação e excreção de partículas virais por aves com infecção latente (Bagust *et al.*, 1995). Além disso, baixas temperaturas mantem as partículas virais viáveis por mais tempo no ambiente, proporcionando maior período para uma possível primo-infecção de aves mais jovens (Dufour-Zavala, 2008). No presente estudo, houve maior detecção de aves infectadas pelo VLTÍ no período do inverno. Na mesma época, constatou-se aumento da ocorrência de outras doenças respiratórias como a bronquite infecciosa, a colibacilose e micoplasmose, frequentemente sem associação com a LTI, possivelmente também influenciada pelos fatores citados anteriormente. Ressaltando que na análise histopatológica, mesmo nas aves provenientes das coletas programadas, outras doenças respiratórias, em principal a micoplasmose, tiveram diagnóstico significativamente maior do que LTI.

Apesar de não ter ocorrido diferença estatística na prevalência de aves positivas quando realizados os diferentes protocolos de vacinação no presente estudo, experimentos em aves

utilizando vacinas vetorizadas HVT-LT e FPV-LT *in ovo*, demonstraram que estas proporcionam proteção parcial contra a LTI, (Deirdre *et al.*, 2010). Além disso, podem influenciar na redução da replicação viral na traqueia e na redução dos sinais clínicos (Vagnozzi *et al.*, 2012). Observações de campo indicam, que em regiões de alto desafio, as vacinas vetorizadas não obtiveram sucesso em completa proteção contra a LTI, porém em regiões de desafio leve a moderado, as vacinas em questão foram eficientes e são uma alternativa mais segura do que o uso contínuo de vacinas do tipo CEO (Deirdre *et al.*, 2010). No caso das granjas da região, os protocolos de aplicação de vacina foram diferentes de Deirdre (2010), onde as aves que receberam HVT-LT foram vacinadas no incubatório, por via subcutânea, no primeiro dia de vida e a vacina FPV-LT foi aplicada na membrana da asa entre 21-35 dias de idade. Quando realizada a análise comparativa entre as aves de uma mesma granja que utilizava duas doses de vacinas e realizou alteração do protocolo vacinal para uma dose durante o período estudado, os resultados mostraram frequência decrescente de positividade para o VLTI para as aves que receberam duas doses, evidenciando diferença na proporção de animais positivos e negativos entre os protocolos vacinais ($p=0,04$). As aves das granjas que receberam dupla vacinação (amostradas no verão de 2017), tiveram menor proporção de positividade na traqueia pela PCR, sugerindo que este protocolo de vacinação promove melhor proteção contra o VLTI. A diminuta proporção de aves apresentando a doença clínica, apesar das altas taxas de positividade a infecção, sugerem que a dupla vacinação influencia na redução da doença clínica, mas não na disseminação do vírus entre aves e entre granjas.

Em relação as linhagens das galinhas, houve diferença estatística entre a linhagem Hyline e Bovans. A linhagem Hyline foi a que apresentou maior positividade ao vírus. No entanto, outros fatores podem ter interferido para esta diferença. Dentre as linhagens analisadas salienta-se que as aves provenientes da linhagem Bovans eram em grande maioria provenientes da granja D, granja que apresenta o maior isolamento dentre as granjas analisadas e a única que não aloja aves da linhagem Hyline. As aves da linhagem Hyline foram amostradas em 6 das 8 granjas, e na grande maioria, eram provenientes das granjas de maior porte, mais próximas de outras granjas e rodovias, com maior número e densidade de aves por galpão. O comportamento mais calmo das aves da linhagem Bovans, comparadas a Hyline também deve ser considerada. Durante os procedimentos de análise clínica destas aves, foi observado que as aves da linhagem Bovans se apresentavam mais calmas, com empenamento mais abundante e com menores taxas de canibalismo em relação a linhagem Hyline. Porém, apresenta taxas de produção menos elevadas do que a Hyline. Devido a grande diferença entre as granjas que possuíam estas

linhagens, não é possível afirmar que essa diferença é real, não sendo possível inferir se realmente há uma maior resistência ao VLTI ou se as condições de biosseguridade e menor intensidade de produção foram responsáveis pela diferença entre as taxas de infecção.

As altas taxas de detecção de DNA viral para as aves desse estudo apontam que a região de Terras Altas da Mantiqueira-MG é uma área cuja circulação viral foi significativa durante o período de estudo. Considerando todo o período de estudo, a região foi caracterizada por granjas com ausência de LTI, granjas com episódios esporádicos de LTI e granjas com surtos mais frequentes. A alta frequência de aves que apresentaram o VLTI em latência, associada a alta densidade de granjas na região e com falhas na biosseguridade, indicam circulação viral elevada. Esta pode ocorrer principalmente por via aérea, como demonstrado por Johnson *et al.* (2005), onde a proximidade com outras granjas e a direção do vento aumentavam significativamente o risco de transmissão do VLTI. Hughes e colaboradores (1989) demonstraram por meio de um estudo, a ocorrência de surtos espontâneos de LTI em situações de campo. Os autores demonstraram que as taxas de excreção viral do VLTI pelo epitélio traqueal podem ser significativamente aumentadas em situações de estresse, como no início da postura, ou misturando aves não familiarizadas, onde as galinhas com infecção latente não são identificadas como possíveis reservatórios, infectando assim aves susceptíveis.

A maioria das granjas da região estudada adotaram medidas de biosseguridade como desinfecção de maquinário, veículos e caixas de transporte, exclusividade de funcionários, vazio sanitário prévio de visitantes. Estas medidas de biosseguridade devem ser comumente associadas com uma distância de segurança entre granjas e a utilização de barreiras físicas (Dufour-Zavala, 2008). No entanto, a proximidade entre as granjas é o maior problema na região. A fundação destas granjas ocorreu antes da consolidação das práticas de biosseguridade, logo é extremamente difícil evitar a circulação de patógenos entre as granjas da região. Algumas das granjas, mesmo que possuindo núcleos de produção com maior biosseguridade, possuem a sua recria extremamente próxima de outras granjas ou, em alguns casos, há uma mesma recria para mais de uma granja onde uma não vacinava e outra realizava vacinação dupla. Amostras recebidas pela vigilância passiva, mostraram a ocorrência de surto de LTI em aves na recria e em aves em início da fase de postura recentemente instaladas nas granjas de produção, demonstrando uma infecção do VLTI já na recria e consequente introdução destas aves em outros núcleos. A região é dependente economicamente da produção de ovos, tornando-se assim inviável a eliminação das aves e um vazio sanitário, já que estas apresentam um ciclo de produção por volta de 100 semanas. A proximidade com o centro urbano e vilas de zonas rurais

também representa riscos sanitários, pois existem um grande número de galinhas de subsistência na região, e como demonstrado por Preis (2013), também ocorre a circulação do VLTI nestas aves, contribuindo para a manutenção da região como zona de ocorrência de surtos da doença.

8. CONCLUSÕES

As vacinas recombinantes vetorizadas, especialmente quando utilizadas duas doses, podem influenciar para a diminuição da porcentagem de aves positivas para o VLTI diminuindo a ocorrência de surtos, quando a interferência dos fatores de risco for menor, porém não impedem a latência.

As granjas que possuíam melhor biosseguridade, menores fatores de risco e que permaneceram com os protocolos de vacinação sem interrupção, as taxas de positividade para o VLTI foram menores, especialmente durante os meses de verão, não sendo observado surtos de LTI.

Nos resultados provenientes da PCR do gene ICP4, não houve diferença estatística na prevalência de positividade nas aves, com diferentes protocolos vacinais com vacinas expressando glicoproteínas distintas do VLTI, com a administração ao primeiro dia de vida ou entre 21-35 dias. Todavia, a ausência de surtos ocorreu no período em que todas as aves, da grande maioria das granjas, eram vacinadas com os dois tipos de vacinas e os fatores de risco eram menores, sugerindo que a administração de duas doses das vacinas vetorizadas recombinantes propiciaram um melhor controle da doença clínica, porém não impedia a circulação do vírus entre aves e entre granjas.

Tanto a traqueia quanto os gânglios são amostras importantes para a detecção do DNA viral pela PCR, não ocorrendo correlação entre ambos. A PCR da mucosa da traqueia detectou maior percentual de aves positivas para o GaHV-1, sugerindo atividade viral com baixa replicação ou persistência durante o período, mesmo com ausência de lesões.

Uma menor taxa de densidade e maiores medidas de biosseguridade nas granjas que não realizaram a vacinação pode ter ajudado na redução de aves com a doença clínica. Quando comparado entre granjas, um menor número de aves positivas para o GaHV-1 foi observado

quando realizado a dupla vacinação e a taxa de aves positivas foi estatisticamente maior durante os meses de inverno.

A análise genética parcial revelou que as sequencias obtidas durante este estudo são diferentes daquelas observadas em São Paulo, outra região do país que presenciou surtos de LTI.

A estirpe viral de campo continuou a circular pela região estudada, possivelmente com uma alta pressão seletiva dado pelo número de casos e outros fatores, e uma outra estirpe geneticamente distinta surgiu no ano de 2018. Estudos realizando sequenciamento completo e a patogenicidade, com estirpes virais da região estudada, devem ser realizados para maiores esclarecimentos, ajudando em um melhor controle da LTI na região.

9. REFERENCIAS

- ADAIR, B. M., TODD, D., MCKILLOP, E.R., BURNS, K. Comparison of serological tests for detection of antibodies to infectious laryngotracheitis virus. *Avian Pathol.* v.14, p.461 – 469,1985.
- ALEXANDER, H.S. e NAGY, E. Polymerase chain reaction to detect infectious laryngotracheitis virus in conjunctival swabs from experimentally infected chickens. *Avian Dis* v.41, p. 646, 1997.
- ARAÚJO, L.M.G., SILVA, R.C.F., SANTOS, J.A., BONACCORSI, R.A., BITTENCOURT, N.R.A., GOMES, T.A. Estudo sobre um foco de Laringotraqueíte infecciosa das galinhas no município de Petrópolis/RJ;características fundamentais da doença e do vírus. PESAGRO-RIO. v.10, p.1–4, 1982.
- ARMSTRONG, W.H. A slide smear technique for the diagnosis of laryngotracheitis. *Avian Dis.* v.3, p.80-84,1959.
- BACK, A., LEÃO, J.A. Laringotraqueíte. Anais do 4º Simpósio Brasil Sul de Avicultura; Chapecó, Santa Catarina. Brasil. p. 50–56,2003.
- BAGUST, T.J. Laryngotracheitis (Gallid-1) herpesvirus infection in the chicken. Latency establishment by wild and vaccine strains of ILT virus. *Avian Pathol.* v. 15, p.581–595,1986.
- BAGUST, T. J. e GUY J. S. *Laryngotracheitis*. In: *Diseases of poultry, 10th ed.* B. W. Calnek, H. J. Barnes, C. W. Beard, L. R. McDougald, and Y. M. Saif eds. Iowa State University Press, Ames, IA. p. 527-539, 1997.
- BAGUST, T.J., JONES, R.C. e GUY, J.S. Avian infectious laryngotracheitis. *Revue Scient. Tech. Off. Int. Epizoot.* v.19, p.483-492, 2000.
- BAUER, B., J.E. LOHR, e E.F. KALETA. Comparison of Commercial ELISA test kits from Australia and the USA with the serum neutralization test in cell cultures for the detection of antibodies to the infectious laryngotracheitis virus of chickens. *Avian Pathol.* v.28, 65–72,1999.
- BAUTISTA, D. Isolation of infectious laryngotracheitis virus (ILTV) from peafowls and chickens with a history of respiratory diseases. *Proceeding of the 140th AVMA Annual Convention*; 2003; Colorado Springs, Colorado. USA. p. 24, 2003.
- BEACH, J. R. The virus of infectious laryngotracheitis. *Science.* v.68, p.570-580, 1926.
- BEACH, JR. Infectious bronchitis of fowls. *J Am Vet Med Ass.* v. 68, p.570-580, 1926
- BEACH, J.R. The virus of laryngotracheitis of fowls. *Science.* v.72, p.633–634, 1930.

- BELTRÃO, N. *et al.* Detecção do vírus da laringotraqueíte das galinhas no Brasil. *Pesq, Vet. Bras.* v.24(2), p.85-88, 2004
- BEAUDETTE, F R. Infectious bronchitis. *N. J. Agric. Exp. Stn. Agric. Rep.* v.51, p.286, 1930.
- BEAUDETTE, F.R. Infectious laryngotracheitis virus. *Poult Sci.* v.16, p.103–105, 1937.
- BLACKER, H.*et al.* Epidemiology of recent outbreaks of infectious laryngotracheitis in poultry in Australia. *Aus Vet J.* v.89(3), p.89–94, 2011.
- BOOM, R. *et al.* Improved silica–guanidiniumthiocyanate DNA isolation procedure based on selective binding of bovine alpha–casein to silica particles. *J. Clin. Microbiol.* v.37, p. 615–619, 1999.
- BRANDLY, C. A., L. D. BUSHNELL. A report of some investigations of infectious laryngotracheitis. *Poult. Sci.* v.13, p. 212–217, 1934.
- BRASIL. Instituto Mineiro de Agropecuária – IMA. Portaria n. 1107, de 30 de novembro de 2010. Estabelece Normas Para Atendimento a Suspeita ou Casos Confirmados de Laringotraqueíte Infecciosa das Aves, Belo Horizonte, 2010.
- BRAUNE, M.O. e GENTRY R.F. Standardization of the fluorescent antibody technique for the detection of avian respiratory viruses. *Avian Dis.* v. 9, p. 535 – 545, 1985.
- BUCHALA, F.G. *Planejamento, implantação e administração de medidas de defesa sanitária animal para o controle da laringotraquíte infecciosa aviária, de 2002 a 2006, na região de Bastos, Estado de São Paulo, Brasil.* 2008. 157f. Tese de doutorado. Faculdade de Ciências agrárias e veterinárias, Universidade Estadual Paulista, São Paulo.
- CHACON, J.L., FERREIRA, A.J.P. Differentiation of field isolates and vaccine strains of infectious laryngotracheitis virus by DNA sequencing. *Vaccine.* v. 27, p.6731–6738, 2009.
- CHACÓN, J. L. *et al.* Persistence and spreading of field and vaccine strains of infectious laryngotracheitis virus (ILTV) in vaccinated and unvaccinated geographic regions, in Brazil. *Trop Anim Health Prod*, 2015.
- CHIN, A. R. P. *et al.* Intervention Strategies for Laryngotracheitis: Impact of Extended Downtime and Enhanced Biosecurity Auditing Intervention Strategies for Laryngotracheitis: Impact of Extended Downtime and Enhanced Biosecurity Auditing. *Avian Dis.* v. 53, n. 4, p. 574–577, 2009.
- CLARKE, J. K. *et al.* Spray Vaccination of Chickens Using Infectious Laryngotracheitis Virus. *Aus. Vet. Journal.* v. 56(9), p.425-428, 1980.
- COPPO, M.J.C, HARTLEY, C. A. e DEVLIN, J. M. Immune responses to infectious laryngotracheitis vírus. *Dev Comp Immunol.* v. 41, p. 454–462, 2013.

- COVER, M. S. The Early History of Infectious Laryngotracheitis. *Avian Dis.* v. 40(3), p. 494-500, 1996.
- COURTNEY, R.J. e BENYESH-MELNICK, M. Isolation and characterization of a large molecular weight polypeptide of herpes simplex virus type 1. *Virology.* v.62, p.539-551, 1974.
- COUTO, R. DE M. *Caracterização patológica e molecular do vírus da laringotraqueíte infecciosa e diagnóstico diferencial em aves comerciais no estado de minas gerais.* 2014, 102f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- COUTO, R. DE M. *et al.* Molecular characterization of infectious laryngotracheitis virus in naturally infected egg layer chickens in a multi-age flock in Brazil. *Arch of Virol.* v.160, p. 241–252, 2015.
- COWDRY, E. V. The problem of intranuclear inclusions in virus diseases. *Archs Pathol.* v.18, p.527-542, 1934.
- CRAWSHAW, G. J., BOYCOTT, B. R. Infectious laryngotracheitis in peafowl and pheasants. *Avian Dis.* v.26, p.397–401, 1982.
- CRESPO, R, *et al.* Comparison of diagnostics techniques in an outbreak of infectious laryngotracheitis from meat chickens. *Avian Dis.* v.51, p.858-862, 2007.
- DAVISON, A. J. Evolution of the herpesviruses. *Vet Microbiol.* v. 22, 86(1-2), p.69-88, 2002.
- DAVISON, S.*et al.* Vaccinal laryngotracheitis: overview in the United States. *In: Proceedings of the 109th Annual Meeting of the United States Animal Health Association, Hershey, PA, USA,* 580, 2005.
- DAVISON, A. Taxonomic proposals from the *Herpesviridae* study group. *International Committee of Taxonomy of Viruses,* 2005. Disponível em <https://talk.ictvonline.org/ictv/proposals/2005.020-72.04.Herpes.pdf/>. Acesso em: 11 nov. 2018.
- DEIRDRE, I. J. *et al.* Protection Against Infectious Laryngotracheitis by In Ovo Vaccination with Commercially Available Viral Vector Recombinant Vaccines. *Avian Dis.* v.54, p. 1251-1259, 2010.
- DIXON, R.A.F. e SCHAFFER, P.A. Fine structure mapping and functional analysis of temperature-sensitive mutants in the gene encoding the herpes simplex virus type 1 immediate early protein VP175. *J. Virol.* v.36, p.189-203, 1980.
- DOBSON, N. Infectious laryngotracheitis in poultry. *Vet. Rec.* v.15, p.1467-1471, 1935.

- DUFOUR-ZAVALA, A. L. Epizootiology of Infectious Laryngotracheitis and Presentation of an Industry Control Program. *Avian Dis.* v. 3(1), p. 3–5, 2008.
- FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* v.39, p.783-791, 1985.
- FITZGERALD, J.E e HANSON, L. E. Comparison of some properties of laryngotracheitis and herpes simplex viruses. *Am J Vet Res.* v.24, p.1297–1303, 1963.
- FRANCO, A. C.; ROEHE, P. M. Herpesviridae. In: FLORES, E. F. (Org.). *Virol Vet. Santa Maria: Ed. da UFSM*, 2007. p. 333.
- FRITZSCHE, K., e GERRIERS E. Gefluegel Krankheiten. *Paul Parry Berlin*, Hamburg, Germany. p. 77-81, 1959.
- FUCHS, W., *et al.* Molecular biology of avian infectious laryngotracheitis virus. *Vet. Res.* v.38, p.261–279, 2007.
- FUCHS, W., *et al.* The non-essential UL50 gene of avian infectious laryngotracheitis virus encodes a functional dUTPase which is not a virulence factor. *J. Gen. Virol.* v. 81, p.627–638, 2000.
- GARCÍA, M. Current and future vaccines and vaccination strategies against infectious laryngotracheitis (ILT) respiratory disease of poultry. *Vet. Microbiol.* v. 206, p. 157–162, 2017.
- GRAHAM, R.F., THROP, F., W.A. JAMES, W.A. Subacute or chronic infectious avian laryngotracheitis. *J Infect Dis.* v.47, p.87–91, 1930.
- GRANZOW, H.*et al.* Egress of alphaherpesviruses: comparative ultrastructural study, *J. Virol.* v. 75, p. 3675–3684, 2001.
- GRIFFIN, A.M. e BOURSNEILL, M.E. Analysis of the nucleotide sequence of DNA from the region of the thymidine kinase gene of infectious laryngotracheitis virus; potential evolutionary relationships between the herpesvirus subfamilies. *J. Gen. Virol.* v.71(4), p.841-850, 1990.
- GUY, J. S., BARNES, H. J. e SMITH, L. G. Increased virulence of modified–live infectious laryngotracheitis vaccine virus following bird-to bird passage. *Avian Dis.* v.35, p.348–355, 1991.
- GUY, J.S., BARNES, H.J., SMITH, L.G. Rapid diagnosis of infectious laryngotracheitis using a monoclonal antibody-based immunoperoxidase procedure. *Avian Pathol.* v. 21, p. 77-86, 1992.
- GUY, J.S., BAGUST, T.J. Laringotracheitis. *Dis poult*, v.11, p. 121-134, 2003.
- GUY, J., e GARCÍA, M. Infectious laryngotracheitis virus. *Dis. of poultry*, v12. p.161-180, 2008

- GWATKIN, R. Some notes on avian diphtheria. *Ont. Vet. Coll. Rep.* p. 54-61. 1925.
- HALVORSON, D. A. Biosecurity on multi-age egg production complex: a 15-year experience. *Avian Dis.* v.55, p.139–142, 2011.
- HIDALGO, H. Infectious Laryngotracheitis: a review. *Braz J Poult Sci.* v.5, p.157–168, 2003.
- HILBINK, FW_ Susceptibility of birds other than chickens to infectious laryngotracheitis. *Tijdsch Diergeneesk.* v.110(11), p.437-439, 1985.
- HINSHAW, W. R. Studies in poultry diseases found in poultry feeding stations. *Nat. Poult., Butter and Egg Bull.* V.9(1-A), p.3-6, 1925.
- HINSHAW. W.R., JONES E.C., GRAYBILL, H.W. A study of mortality and egg production in flocks affected with laryngotracheitis. *Poultry Sci.* v. 10, p.375-382, 1931.
- HINSHAW, W. R. A survey of ILT of fowls. *Calif. Agric. Exp. Stn. Bull.* v.520, p.1-36, 1931.
- HIPÓLITO, O. *et al.* Isolamento e identificação do vírus da Laringotraqueite infecciosa das galinhas no Brasil. *Cong Bras Microbiol; Rio de Janeiro, RJ. Brasil.* p. 16. 1974.
- HUGHES C.S. e JONES R.C. Comparison of methods of isolation of infectious laryngotracheitis from field material. *Avian Pathol.* v.17, p, 295- 303. 1988.
- HUGHES, C.S. *et.al.* Effects of certain stress factors on the re-excretion of infectious laryngotracheitis virus from latently infected carrier birds. *Res Vet Sci.* v.46, p.274–276, 1989.
- IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Agropecuária, Pesquisa da Pecuária Municipal 2017. Prod. Pec. munic., Rio de Janeiro, v. 45, p.1-8, 2017
- INDEA – MT, Instituto de Defesa Agropecuária do Estado de Mato Grosso, Indea monitora granjas comerciais após confirmação de laringotraqueite. Disponível em <http://www.indea.mt.gov.br/-/indea-monitora-granjas-comerciais-apos-confirmacao-de-laringotraqueite?inheritRedirect=true>. Acesso em: 21 nov, 2018.
- JOHNSON, M. A. *et al.* Gallid herpesvirus 1 (infectious laryngotracheitis virus): cloning and physical maps of the SA-2 strain. *Arch Virol.*, v. 119, p. 181-198, 1991.
- JOHNSON, M. A., *et al.* Nucleotide sequence of infectious laryngotracheitis virus (gallid herpesvirus 1) ICP4 gene. *Virus Res.* v.35(2), p.193–20,1995.
- JOHNSON, Y. J. *et al.* Wind-borne transmission of infectious laryngotracheitis between commercial poultry operations. *Int J Poult Sci.* v.4, p.263–267, 2005.
- JOHNSON, D. I. *et al.* Protection against infectious laryngotracheitis by in ovo vaccination with commercially available viral vector recombinant vaccines. *Avian Dis.* v. 54, n. 4, p. 1251–1259, 2010.

- JORDAN, F. T. W. Some observations of infectious laryngotracheitis. *Vet Rec.* v.70, p.605-610, 1958.
- JORDAN, F.T.W. Diagnosis of infectious laryngotracheitis by chick embryo inoculation. *J Comp Pathol.* v.74, p.119 – 128, 1964.
- JORDAN, F.T. A review of the literature on infectious larynotracheitis (ILT). *Avian Dis.* v.10, p.1–26, 1966.
- JORDAN, F.T., H.M. EVANSON, AND J.M. BENNETT. The survival of the virus of infectious laryngotracheitis. *Zentralbl Veterinarmed B.* v.14, p.135–150. 1967.
- KALETA, E.F. Herpesviruses of birds – a review. *Avian Pathol.* v.19, p. 193-211, 1990.
- KERNOHAN, G. Infectious laryngotracheitis in pheasants. *J Am Vet Med Assoc.* v.78, p.553–555, 1931.
- KINGSBURY, F. W.; JUNGHER, E. L. Indirect transmission of infectious laryngotracheitis in chickens. *Avian Dis* v. 2(1), p. 54-63, 1958.
- KERNOHAN, G. Infectious laryngotracheitis in fowls. *J Am Vet Med Ass.* v. 78, p.196-202, 1931.
- KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for bigger datasets. *Mol Bio Evol.*v.33, p. 1870-1874, 2016.
- LEISEQUIA, L.M.L. Impacto Económico de Laringotraqueitis infecciosa aviar em una granja de pollos de carne del departamento de Lima [dissertation]. Lima (PE): Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2013.
- LI, Y.P. *et al.* Evaluation of the suitability of six host genes as internal control in real-time RT-PCR assays in chicken embryo cell cultures infected with infectious bursal disease virus. *Vet. Microbiol.* v. 110, p. 155–165, 2005.
- LINARES, J.A. *et al.* An outbreak of infectious laryngotracheitis in California broilers. *Avian Dis.* v.38, p. 188-192, 1994.
- MAGNUSSON, H. My Honssjukdom. (Inf. Inflaryngotrakeit.) *Scand. Vet Tidskr.* v.30, p.629-631, 1940.
- MAPA, *Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento* – Detalhamento do quantitativo de casos - Doença Laringotraqueíte infecciosa aviária. disponível em : <http://indicadores.agricultura.gov.br/QvAjaxZfc/QvsViewClient.aspx?public=only&size=long&host=QVS%40masrv1005&name=Temp/c97179c42ce84e8397b48aa937ca3e6a.html>.
- Acesso em: 17 de dez de 2018.
- MAREK, K. Zakazny Laryngotracheitis Kur. *Med Weter.* v.4, p.767-770, 1948.

- MAY, H. G. e TITSLER, R. P. Tracheo laryngitis in poultry. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* v.67, p.229- 231, 1925.
- MCNULTY, M.S., ALLAN, G.M. e MCCracken, R.M. Infectious laryngotracheitis in Ireland. *Irish Vet. J.* v.39, p. 124 -125, 1985.
- MENENDEZ, K. R., GARCÍA, M., SPATZ, S., e TABLANTE, N. L. Molecular epidemiology of infectious laryngotracheitis: a review. *Avian Pathol.*, v.43(2), p.108–117, 2014.
- NCBI, National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine. Disponível em: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Acesso em: 20 jan, 2017.
- OIE, Office *International des Epizooties*. *Avian Infectious Laryngotracheitis*. Terrestrial Manual, 2.3.3. p.1-11, 2014.
- OLDONI, I., GARCIA M. Characterization of infectious laryngotracheitis virus isolates from the US by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism of multiple genome regions. *Avian Pathol.* v.36, p.167–176, 2007.
- OLDONI, I. *et al.* Characterization of infectious laryngotracheitis virus (ILTV) isolates from commercial poultry by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). *Avian Dis.* v.52, p.59–63, 2008.
- OLDONI, I., RODRIGUEZ-AVILA, A., RIBLET, S.M., ZAVALA, G., GARCÍA, M. Pathogenicity and growth characteristics of selected infectious laryngotracheitis virus strains from the United States. *Avian Pathol.* v.38, p. 47–53, 2009.
- OU, S.C., GIAMBRONE, J.J., MACKLIN, K.S. Infectious laryngotracheitis vaccine virus detection in water lines and effectiveness of sanitizers for inactivating the virus. *J Appl Poul Res.* v.20, p.223–230, 2011.
- OU, S.C., GIAMBRONE, J.J., MACKLIN, K.S. Detection of infectious laryngotracheitis virus from darkling beetles and their immature stage (lesser mealworms) by quantitative polymerase chain reaction and virus isolation. *J Appl Poul Res.* v.21, p. 33–38, 2012.
- OWOADE, A. A., DUCATEZ, M. F., MULLER, C.P. Seroprevalence of Avian Influenza Virus, Infectious Bronchitis Virus, Reovirus, Avian Pneumovirus, Infectious Laryngotracheitis Virus, and Avian Leukosis Virus in Nigerian Poultry. *Avian Dis.* v.50(2), p.222-227, 2006.
- PARRA, S. H. S. *et al.* Persistence of the tissue culture origin vaccine for infectious laryngotracheitis virus in commercial chicken flocks in Brazil. *Poultry Sci.* v. 94, p. 2608–2615, 2015.
- PARRA, S.H.S., NUÑEZ, L.F.N.I., FERREIRA, A.J.P. Epidemiology of Avian Infectious Laryngotracheitis with Special Focus to South America: an update. *Braz J of Poultry Sci.* v.18(4), p. 551-562, 2016.

- PIROZOK, R.P., HELMBOLDT, C.F. e JUNGHERR, E.L. A rapid histological technique for the diagnosis of avian infectious laryngotracheitis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* v. 130, p. 406 - 407, 1957.
- PORTZ, C. *et al.* Natural infection of turkeys by infectious laryngotracheitis virus. *Vet. Microbiol.* v. 131, p. 57–64, 2008.
- PREIS, I. S. *Achados patológicos e aspectos moleculares do vírus da laringotraqueíte infecciosa em um surto em galinhas no sul de Minas Gerais. 2013. 64f.* Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- PREIS, I. S. *et al.* Outbreak of infectious laryngotracheitis in large multi-age egg layer chicken flocks in Minas Gerais, Brazil. *Pesq. Vet. Bras.* v. 33(5), p. 591–596, 2013.
- PURCELL, D.A. The ultrastructural changes produced by infectious laryngotracheitis virus in tracheal epithelium of the fowl. *Res Vet Sci.* v.12, p.455-458, 1971.
- PURCELL, D. A. e SURMAN P. G. Letter: aerosol administration of the SA-2 vaccine strain of infectious laryngotracheitis virus. *Aust. Vet. J.* v.50, p.419–420, 1974.
- QUIROZ, C., NOGUERA, C., INFANTE, D., LEON, A. Tipos de vacunas contra enfermedades de las aves que se usan en Venezuela. *Fonaip Divulga (Venezuela).* v. 1, p. 25-29, 1982.
- RISLAKKI, V. Case report: infectious laryngotracheitis of poultry in Finland. *Avian Dis.* v.9, p.339-342, 1965.
- ROBERTSON, G. M., e EGERTON, J. R. Replication of infectious laryngotracheitis virus in chickens following vaccination. *Aust. Vet. J.* v.57, p.119–123, 1981.
- SAIF, Y. M. Efficacy and safety of a recombinant herpesvirus of turkeys containing genes from infectious laryngotracheitis virus.: *Proc. 130th Annual Meeting of the American Veterinary Medical Association (AVMA) Convention, Minneapolis, MD.* p. 154, 1994.
- SAITOU, N. e NEI, M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* v. 4, p. 406-425, 1987.
- SARY, K.*et al.* Esophagitis and pharyngitis associated with avian infectious laryngotracheitis in Backyard chickens: two cases. *Avian Dis.* v. 61. p. 255-260, 2017.
- SEDDON, H. R., HART, L. The occurrence of infectious laryngotracheitis in New South Wales. *Aust. Vet. J.* v.11, p. 212-222, 1935.
- SELLERS, H.*et al.* Mild infectious laryngotracheitis in broilers in Southeast. *Avian Dis.* v.48, p.430-436, 2004.

- SCHNITZLEIN, W.M., RADZEVICIUS, J., TRIPATHY, D. N. Propagation of infectious laryngotracheitis virus in an avian liver cell line. *Avian Dis.* v.38, p. 211–217, 1994.
- SCHOLZ, E., PORTER, R.E. E., GUO, P. Differential diagnosis of infectious laryngotracheitis from other avian respiratory disease by a simplified PCR procedure. *J. Virol. Meth.* v.50, p. 313–322, 1994.
- SOARES, L.A., PEREIRA, O.A.C., HIPÓLITO, O. Characterization of the first strain of infectious laryngotracheitis virus (ILTV) in Brazil chicken. *Revue of Microbiology.*; v.11, p.104–109, 1980.
- SUN, H. L. *et al.* Protection of Chickens from Newcastle Disease and Infectious Laryngotracheitis with a Recombinant Fowlpox Virus Co-Expressing the F, HN Genes of Newcastle Disease Virus and gB Gene of Infectious Laryngotracheitis Virus. *Avian Dis.* v.52(1), p. 111–117, 2008.
- TAMURA, K. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+C-content biases. *Mol Biol Evol.*, v 9, p. 678–687, 1992.
- THOMPSON, J.D., HIGGINS, D.G., GIBSON, T.J.. Clustal W: Improving the Sensitivity of Progressive Multiple Sequence Alignment through Sequence Weighting, Position-Specific Gap Penalties and Weight Matrix Choice. *Nucleic Acids Research*, v. 22, p. 4673–4680, 1994.
- TOCANTINS, B. B. *Laringotraqueíte infecciosa aviária em criações não tecnificadas de galinhas no distrito federal.* 2014. 98f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade de Brasília, Brasília – DF.
- TRIPATHY, D.N. Infectious laryngotracheitis. In Isolation and identification of avian pathogens. *Avian Dis Dig, Inc.*, v.4, p.111–115, 1998.
- TRIPATHY, D.N., GARCÍA, M. Laryngotracheitis. In: A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens. *Avian Dis Dig*, Jacksonville, Florida. p. 94–98, 2008.
- UDDIN, M. I. *et al.* Seroepidemiology of Infectious Laryngotracheitis (ILT) in the Commercial Layer Farms of Chittagong District, Bangladesh. *Adv. Anim Vet Sci.* v. 2 (6), p.316 – 320, 2015
- VAGNOZZI, A. *et al.* Protection induced by commercially available live-attenuated and recombinant viral vector vaccines against infectious laryngotracheitis virus in broiler chickens. *Avian Pathol.* v.41, p.21–31, 2012.
- VANDERKOP, M.A. Infectious laryngotracheitis in commercial broiler chickens. *Can Vet J.* v.34, p.185, 1993.
- VAN HEELSBERGEN, T. Handbuch der Geflueglkrankheiten und Gefluegel-zuch. *Ferdinand Enke, Stuttgart, Germany.* p. 262–264, 1929.

- VAN KAMMEN, A. e SPADBROW P.B. Rapid diagnosis of some avian virus diseases. *Avian Dis.* v.20, p. 748 -751, 1976.
- VARGAS, R.E.S. *Laringotraqueíte infecciosa das aves: estudo epidemiológico em plantéis avícolas no Estado do Rio Grande do Sul.* 1995. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Rio Grande do Sul, Porto Alegre - RS.
- VOGELSTEIN, B., GILLESPIE, D. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *P Natl Acad. Sci. USA.* v.76, p. 615–619, 1979.
- WILKS, C.R. e KOGAN, V.G. An immunofluorescence diagnostic test for avian infectious laryngotracheitis. *Aust Vet. J.* v.55, p.385- 388. 1979.
- WILLIAMS, R. A. *et al.* Demonstration of sites of latency of infectious laryngotracheitis virus using the polymerase chain reaction. *J Gen Virol.* v.73, p.2415–2420, 1992.
- WILLIAMS, R.A., SAVAGE, C.E. e JONES, R.C. A comparison of direct electron microscopy, virus isolation and a DNA amplification method for the detection of avian infectious laryngotracheitis virus in field material. *Avian Pathol.*, v.23, p.709- 720, 1994.
- YAMADA, S., MATSUO, K., FUKUDA, T., UCHINUNO, Y. Susceptibility of ducks to the virus of infectious laryngotracheitis. *Avian Dis.*v.24, p.930–938, 1980.
- YORK, J. J., SONZA, S., FAHEY, K. J. Immunogenic Glycoproteins of Infectious Laryngotracheitis Herpesvirus. *Virology*, v. 161(2), p. 340-347, 1987.
- YORK, J.J. e FAHEY, K.J. Diagnosis of infectious laryngotracheitis using a monoclonal antibody ELISA. *Avian Pathol.* v.17, p.173 182, 1988.
- ZHAO, W. *et al.* Newcastle Disease Virus (NDV) Recombinants Expressing Infectious Laryngotracheitis Virus (ILTV) Glycoproteins gB and gD Protect Chickens against ILTV and NDV Challenges. *J Virol.* v.88(15), p.8397–8406, 2014.

10. ANEXOS

10.1 - Anexo 1



INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA
(AUTARQUIA CRIADA PELA LEI Nº 10.594, DE 7-1-1992)
(VINCULADA À SECRETARIA DE ESTADO DE AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO)

PORTARIA Nº 1107, DE 30 DE NOVEMBRO DE 2010.

ESTABELECE NORMAS PARA ATENDIMENTO A SUSPEITA OU CASOS CONFIRMADOS DE LARINGOTRAQUEÍTE INFECCIOSA DAS AVES.

O DIRETOR-GERAL DO INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA - IMA, no uso das atribuições que lhe são conferidas pelo artigo 13, incisos I, VIII e IX, combinados com o artigo 3º, incisos II, XXIV letra b, e XXXIV do Regulamento a que se refere o Decreto nº 44611, de 10 de setembro de 2007, e considerando a importância da avicultura, o risco sanitário da ocorrência de Laringotraqueíte Infecciosa das aves em granjas avícolas na região sul do Estado, bem como o significativo comércio de ovos dessa região,

RESOLVE:

Art. 1º - Fica delimitada uma área de atenção e vigilância epidemiológica para Laringotraqueíte Infecciosa das aves, que compreende os municípios de Itanhandú, Itamonte, Passa Quatro e Pouso Alto.

Art. 2º - Ficam interditas todas as propriedades avícolas dos municípios citados no artigo 1º desta portaria.

Parágrafo único: A saída de aves e excretas das aves das granjas envolvidas fica condicionada a autorização prévia do IMA, com rota e destino definido, em horário comercial. O veículo transportador deverá obedecer a sua capacidade, assim como a carga deve estar totalmente coberta e protegida para evitar derramamento.

Art. 3º - O médico veterinário responsável técnico fica obrigado a notificar imediatamente ao IMA qualquer suspeita de Laringotraqueíte Infecciosa das Aves.

Art. 4º - É vedado ao médico veterinário, responsável técnico e habilitado para emissão de GTA de aves, emitir esse documento por tempo indeterminado.

Parágrafo único: O profissional que descumprir o determinado nos artigos 3º e 4º, terá sua habilitação cancelada e estará sujeito a processo ético no CRMV.



INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA
(AUTARQUIA CRIADA PELA LEI Nº 10.594, DE 7-1-1992)
(VINCULADA À SECRETARIA DE ESTADO DE AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO)

Art. 5º - Fica determinada a instalação de arcolúvio ou bomba de aspersão na saída das granjas, às custas das empresas envolvidas, para desinfecção de quaisquer veículos sendo eles transportadores de excretas, ovos, aves de descarte ou outros.

Parágrafo único: Os interessados devem apresentar por escrito ao IMA, para autorização prévia, a forma de utilização, assim como o local de instalação e o(s) produto(s) a ser (em) utilizado (s).

Art. 6º - Fica proibida a reutilização de caixas ou outras embalagens utilizadas para o transporte de ovos.

Art. 7º - Fica proibida a prática de “muda forçada” nas granjas envolvidas.

Art. 8º - Todas as aves com sintomatologia clínica da Laringotraqueíte Infecciosa devem ser eliminadas e a compostagem deve ser feita dentro da propriedade.

Art. 9º - Outras medidas sanitárias poderão ser adotadas e municípios poderão ser incluídos ou retirados da área sob atenção, conforme a progressão ou controle da Laringotraqueíte Infecciosa no Estado.

Art. 10º - Esta Portaria entra em vigor na data de sua publicação.

Belo Horizonte, 30 de novembro de 2010.

Altino Rodrigues Neto
Diretor-Geral

10.2 - Anexo 2



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Senhor(a) Professor(a) Roselene Ecco,

Após análise de sua solicitação de avaliação do projeto LARINGOTRAQUEÍTE INFECCIOSA AVIÁRIA: MONITORAMENTO DE UMA ÁREA INTERDITADA PARA CONTROLE E ERRADICAÇÃO DA DOENÇA, submetido a esta comissão pelo protocolo 78 / 2014, a CEUA decidiu **aprovar** a sua solicitação.

Justificativa: Aprovado na reunião do dia 11/08/2014.

Para acessar ao seu projeto clique no link:

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Belo Horizonte, 12/08/2014.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

10.3 - Anexo 3



ESCOLA DE VETERINÁRIA DA UFMG

COLEGIADO DOS PROGRAMAS DE PÓS-GRADUAÇÃO

Av. Antônio Carlos 6627 – CP 567 – CEP 31270-901 – Belo Horizonte – MG

FONES (31)3409 2261 – FAX (31)3409 2930

TERMO DE CONSENTIMENTO

Pesquisador Responsável: Roselene Ecco

Título da pesquisa: Laringotraqueíte infecciosa aviária: monitoramento de uma área interditada para controle da doença

Identificação da granja: _____

Proprietário/ Responsável: _____

Número de cadastro IMA: _____

Eu _____, CPF _____ confirmo que a Profa. Roselene Ecco explicou os objetivos desta pesquisa, bem como a forma de participação. As alternativas para minha participação também foram discutidas. Eu li e compreendi este termo de consentimento, portanto, eu concordo em dar meu consentimento para participar como voluntário deste estudo.

_____, _____ de _____ de _____

(Nome do participante)

Prof^ª. Dr^ª. Roselene Ecco

Coordenadora

10.4 – Anexo 4 - Resultados e linhagem das aves amostradas na vigilância ativa e positivas na PCR.

Granja	Inverno 2014			Verão 2015			Inverno 2015			Verão 2016		
	Aves por lote /positivas PCR	Semanas/ Vacina	Linhagem	Aves por lote /positivas PCR	Semanas/Vacina	Linhagem	Aves por lote /positivas PCR	Semanas/ Vacina	Linhagem	Aves por lote /positivas PCR	Semanas/ Vacina	Linhagem
A	9/4 ^{TG}	36/NV	-	9/1 ^T	47/NV	-	-	-	-	-	-	-
	9/2 ^T	56/ NV	-	9/3 ^{G*}	107/NV	-	-	-	-	-	-	-
	9/3 ^{TG}	116/ NV	-									
B	9/6 ^{TG}	32/HVT-LT	Hyline white	9/1 ^G	25/Ambas	Hisex white	9/2 ^G	96/Ambas	Hyline white	9/0	70/Ambas	Hyline white
	9/9 ^{G*}	18/Ambas	Hisex white	9/0	68/Ambas	Hyline white	9/1 ^T	43/Ambas	Hyline white	9/0	27/HVT-LT	Hyline white
C	9/7 ^{TG*}	38/FP-LT	Hyline white	9/0	35/FP-LT	Dekalb white	9/1 [*]	38/FP-LT	Dekalb White	9/7 ^T	55/FP-LT	Dekalb White
	9/6 ^{TG*}	71/FP-LT	Hyline white	9/1 ^T	83/FP-LT	Dekalb white	9/1 [*]	82/FP-LT	Dekalb White	9/0	65/FP-LT	Dekalb White
D	9/2 ^G	36/FP-LT	Bovans white	9/4 ^{G*}	29/FP-LT	Bovans white	9/1 ^G	36/FP-LT	Bovans white	9/2 ^G	46/FP-LT	Bovans white
	9/3 ^{G*}	58/FP-LT	Bovans white	9/1 [*]	93/FP-LT	Bovans white	9/2 ^T	85/FP-LT	Bovans white	9/0	96/FP-LT	Bovans white
E	18/12 ^T	33/Ambas	Hyline white	9/5 ^{G*}	35/Ambas	Hyline white	9/5 ^{TG}	45/HVT-LT	Hyline white	9/6 ^{G*}	34/HVT-LT	Hyline white
	18/3 ^T	60/Ambas	Hyline white	9/5 ^{TG}	65/Ambas	Hyline white	9/1 ^T	65/Ambas	Hyline white	9/2 [*]	43/HVT-LT	Hyline white
				9/5 ^{TG*}	89/Ambas	Hyline white	9/3 ^{TG*}	30/HVT-LT	Hyline white	9/0	81/HVT-LT	Hyline white
F	9/7 ^{TG}	41/HVT-LT	Hisex white	9/4 ^T	30/FP-LT	Hyline white	6/3 ^{TG}	19/HVT-LT	Dekalb White	9/0	28/HVT-LT	Hisex white
	9/8 ^{TG*}	88/HVT-LT	Hisex white	9/1 ^G	90/FP-LT	Hyline white	9/2 ^{TG}	34/HVT-LT	Hyline white	9/0	88/HVT-LT	Hisex white
							9/2 ^{TG}	87/HVT-LT	Hyline white	3/0	21/HVT-LT	Hisex white
G	9/4 ^G	38/HVT-LT	Hyline White	9/4 ^T	34/HVT-LT	Hyline white	9/1 ^T	34/HVT-LT	Hisex white	9/3 ^T	37/HVT-LT	Hyline white
	9/3 ^{TG}	85/HVT-LT	Dekalb White	9/1 ^G	73/HVT-LT	Hyline white	9/0	87/HVT-LT	Dekalb White	9/6 ^T	81/HVT-LT	Hyline white
H	9/9 ^{TG*}	50/NV	Hyline white	9/3 ^{TG*}	44/NV	Hyline white	9/1 ^T	40/NV	Hyline white	9/1 ^G	75/NV	Hyline white
	9/9 ^{TG*}	67/NV	Hyline white	9/5 ^T	98/NV	Hyline white	9/4 ^T	70/NV	Hyline white	9/0	95/NV	Hyline white
							9/2 ^T	49/NV	Hyline white	9/1 ^G	66/NV	Hyline white
Total de aves por coleta												
/Positivas PCR		172/97	(56,39%)		153/44	(28,75%)		150/32	(21,33%)		147/28	(19,04%)

Legenda: NV= Não vacinada; ^T= aves com diagnósticos positivos somente na traqueia; ^G= aves com diagnósticos positivos somente no gânglio do nervo trigêmeo (GT); * = aves com diagnósticos positivos na traqueia e GT

Anexo 4 (continuação): Aves amostradas na vigilância ativa positivas na PCR

Granja	Aves por lote /positivas PCR	Inverno 2016		Aves por lote /positivas PCR	Verão 2017		Total de aves por granja /Positivas PCR
		Semanas/Vacina	Linhagem		Semanas/Vacina	Linhagem	
A	-	-	-	-	-	-	45/13 (28,88%)
	-	-	-	-	-	-	
B	9/2 ^G	38/HVT-LT	Hisex brown	9/1 ^T	33/HVT-LT	Hisex white	152/28(18,42%)
	10/4 ^T	54/HVT-LT	Hisex white	9/0	79/HVT-LT	Hisex white	
	15/1 ^T	35/HVT-LT	Hisex white	8/0	9/Ambas	Hisex white	
	12/1 ^T	15/HVT-LT	Hyline white	8/0	13/Ambas	Hisex white	
C	9/2 ^{TG}	30/FP-LT	Dekalb white	9/0	20/FP-LT	Loman white	108/32(29,62%)
	9/4 ^{G*}	88/FP-LT	Dekalb white	9/3 ^T	73/FP-LT	Dekalb white	
D	9/0	40/FP-LT	Bovans white	9/1 ^G	31/FP-LT	Isa brown	110/17(15,45%)
	9/0	89/FP-LT	Bovans white	9/1 ^T	97/FP-LT	Bovans white	
	2/0	72/FP-LT	Bovans white				
E	9/2 ^T	26/HVT-LT	Hyline white	9/4 ^T	38/HVT-LT	Hyline white	177/61(34,46%)
	12/1 ^T	34/HVT-LT	Hyline white	9/1 ^T	25/HVT-LT	Hyline white	
	9/3 ^T	84/HVT-LT	Hyline white	9/3 ^T	86/HVT-LT	Hyline white	
	2/0	13/HVT-LT	Hyline white			Dekalb white	
F	9/2 ^T	43/HVT-LT	Hyline white	9/8 ^T	39/HVT-LT	Dekalb white	126/44(34,92%)
	9/2 ^G	88/HVT-LT	Hyline white	8/1 ^T	97/HVT-LT	Dekalb white	
	6/3 ^{TG}	36/HVT-LT	Hisex white	4/1 ^T	19/Ambas	Hisex white	
G	9/3 ^T	34/HVT-LT	Hisex white	9/3 ^T	38/HVT-LT	Bovans white	108/38(35,18%)
	9/3 ^T	79/FP-LT	Bovans white	9/7 ^T	80/HVT-LT	Hyline white	
H	13/3 ^T	88/NV	Hyline white	10/3 ^T	109/NV	Hyline white	137/45(32,84%)
	14/2 ^T	98/NV	Hyline white	10/2 ^T	20/NV	Isa brown	
Total de aves por coleta /Positivas PCR		185/38	(20,54%)	156/39	(25%)	963/278 (28,86%)	

Legenda: NV= Não vacinada; ^T= aves com diagnósticos positivos somente na traqueia; ^G= aves com diagnósticos positivos somente no gânglio do nervo trigêmeo (GT); * = aves com diagnósticos positivos na traqueia e GT

