

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

Philippe Anibal Leão

**PROVENTRICULITE VIRAL TRANSMISSÍVEL EM FRANGOS DE CORTE
NATURALMENTE INFECTADOS**

Belo Horizonte
2019

Philippe Anibal Leão

**PROVENTRICULITE VIRAL TRANSMISSÍVEL EM FRANGOS DE CORTE
NATURALMENTE INFECTADOS**

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

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

Belo Horizonte
2019

L437p Leão, Philipe Anibal, 1989.
Proventriculite viral transmissível em frangos de corte naturalmente infectados / Philipe Anibal Leão - 2019.

57p.: il.

Orientadora: Roselene Ecco

Dissertação de Mestrado apresentado a Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais.

1- Galinha – Doenças - Teses - 2 – Histopatologia Veterinária – Teses - 3 – Birnaviridae– Teses – I – Ecco, Roselene – II - Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária – III – Título.

CDD – 636.08969

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes – CRB2569

FOLHA DE APROVAÇÃO

PHILIPPE ANIBAL LEÃO

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 28 de Fevereiro de 2019, pela banca constituída pelos membros:

Roselene Ecco

Prof^a. Roselene Ecco
Presidente - Orientador

Oliveiro Caetano de Freitas Neto

Prof. Oliveira Caetano de Freitas Neto
Escola de Veterinária - UFMG

Juliana Fortes Vilarinho Braga

Prof^a. Juliana Fortes Vilarinho Braga
Universidade Federal Rural do Semi-Arido - UFERSA

Maurício Resende

Prof. Maurício Resende
Escola de Veterinária - UFMG

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Dilcenir e Ailton, agradeço pela educação, amor incondicional e suporte que sempre tive. Vocês são meus maiores incentivadores e principais responsáveis por eu ter me tornado o que me tornei. Tenho muito orgulho de ser seu filho. Ao meu irmão Thiago que sempre esteve presente na minha vida e me ajudou muito a construir a pessoa que sou hoje. Aos meus familiares eu agradeço por terem me ajudado desde os meus primeiros passos, sou eternamente grato pelo importante papel que vocês têm na minha vida.

À Escola de Veterinária da UFMG, que me deixa honrado em fazer parte da sua notável história que é também, parte importante da história da medicina veterinária no Brasil. À banca examinadora, pelas sugestões e críticas. À CAPES pelo apoio financeiro do projeto, a FAPEMIG pela concessão da bolsa e ao médico veterinário Bruno Reis pela ajuda na realização do projeto.

À professora Roselene Ecco que me ajudou não só no aprendizado, mas também no crescimento profissional. Terminei o mestrado não só com um título, mas com conhecimento e bagagem que certamente vão fazer a diferença na minha carreira.

Ao professor Maurício Resende pelo apoio voluntário ao projeto, agradeço cada segundo da sua atenção e cooperação. Sua paciência e dedicação foram primordiais a execução deste trabalho.

À minha princesca Juliana que durante todo o mestrado foi minha amiga, parceira e confidente. Me trouxe para a terra quando eu parecia mais próximo da lua. Você me deu apoio, carinho, conselhos e o principal, me deu muito amor. Ninguém sabe melhor do que você o desafio que foi essa jornada, obrigado por me ajudar a superá-la.

Aos meus amigos e irmãos Ecco *team* e agregados UFMG. Vocês transformaram um período tão desafiador em alegria e tenho em vocês a maior conquista que tive no mestrado, que é a sua amizade!

Aos meus amigos da vida, amigos da família, amigos da escola, amigos da PUC, amigos de bairro, amigos de intercâmbios, amigos de viagens, amigos de trabalho. Vocês são um dos bens mais preciosos que cultivo, cada um da sua maneira e do seu jeito, me ajuda a ser sempre uma pessoa melhor e principalmente, uma pessoa muito alegre e feliz.

AMO VOCÊS!

“We are not here concerned with hopes or fears, only with truth as far as our reason permits us to discover it.”

Charles Darwin, The Descent Man

RESUMO

O vírus da proventriculite necrótica das aves (CPNV, do inglês, *chicken proventricular necrosis virus*) tem sido estudado e indicado por alguns pesquisadores como o agente etiológico da proventriculite viral transmissível (TVP, do inglês, *transmissible viral proventriculitis*). Objetivou-se investigar a ocorrência de TVP (primeiro relato no Brasil), utilizando proventrículos de frangos de corte para avaliação histopatológica e identificação do gene VP1 do CPNV por RT-PCR e sequenciamento. Foram examinados 73 frangos provenientes de lotes da região Sudeste brasileira com histórico de atraso no desenvolvimento corporal e baixo peso. Os frangos eram da linhagem *Cobb* com 25 a 36 dias de idade. Os proventrículos foram avaliados macroscopicamente e pela histopatologia, estabelecendo escores para as lesões. Foram, também, avaliadas as diferenças entre espessura da parede do proventrículo e peso vivo, considerando o padrão *Cobb* 500. Frangos de todas as idades tiveram lesões histológicas e RT-PCR positivo, contudo, houve maior severidade e incidência de lesões aos 33 dias e maior positividade aos 28 dias de idade. Não houve associação ao comparar peso vivo pelo padrão *Cobb* 500, histopatologia e RT-PCR, quando o peso vivo foi corrigido retirando a influência dos lotes. No total, 73 proventrículos foram examinados macroscopicamente e por histopatologia e 67 também examinados por RT-PCR. Em 47,9% dos proventrículos, foram encontradas lesões características de TVP, principalmente infiltrado linfo-histioplasmocitário intersticial, necrose do epitélio glandular e ectasia glandular. Em 35,8% das aves detectou-se RT-PCR positivo. Somente 6,8% das aves apresentaram aumento da espessura da parede dos proventrículos. Proventrículos com lesão histológica de TVP tiveram espessura maior que aqueles sem lesão. Contudo, o baixo percentual de alterações macroscópicas e a maior ocorrência de lesões histológicas sem aumento macroscópico da espessura da parede reforçam a hipótese de doença subdiagnosticada. O sequenciamento de um fragmento do gene VP1 do CNPV revelou similaridade genética entre 87,01% a 92,68% com outras sequências desse mesmo gene, relatado nos EUA, Reino Unido e Espanha. Este é o primeiro relato de TVP no Brasil e reforça o CPNV como agente da doença. No entanto mais estudos referentes aos efeitos na produtividade e coinfeções são necessários para melhor compreensão da doença.

Palavras chave: TVP, CPNV, birnavírus, histopatologia, RT-PCR.

ABSTRACT

The chicken proventricular necrotic virus (CPNV) has been studied and researches have indicated it as the etiologic agent of transmissible viral proventriculitis (TVP). The aim of this study was to investigate the occurrence of TVP (first report in Brazil), using broilers proventriculus to histopathology analysis and identification of the VP1 gene from CPNV by RT-PCR and sequencing. In the pathology department, 73 broilers from flocks of the Brazilian southeast region with history of decreased body weight and stunted growth were examined. The birds were Cobb with 25 to 36 days of age. The proventriculus were examined macroscopically and microscopically, and scores for the histological lesions were established. The difference in the proventricular wall thickness and body weight were also evaluated considering the pattern for Cobb 500 for body weight. Broilers from all ages had histopathologic lesions and were RT-PCR positive, however, there were higher histologic severity and incidence at 33 days of age and RT-PCR positivity in 28 days of age. There was no association between body weight by the Cobb 500 pattern, histopathology and RT-PCR when the body weight was corrected removing the flock influence. Totally, 73 proventriculus were examined macroscopically and microscopically and 67 also tested by RT-PCR. In 47,9% of the proventriculus, were observed microscopic lesions of TVP, mainly glandular epithelial necrosis, epithelial duct hyperplasia with replacement of glandular epithelium by ductal epithelium, expansion of the interstitial glandular space by inflammatory infiltrate as well as glandular ectasia. In 35,8% of the broilers the RT-PCR were positive for VP1. Only 6,8% of the broilers showed enlargement of the proventricular wall. Proventriculus with TVP histologic lesions had higher wall thickness. Nonetheless, the low percentage of proventriculus with microscopic lesions without proventriculus enlargement strengthen the hypothesis of subdiagnosed disease. The sequencing of a VP1 gene fragment from CPNV reveled genetic similarity between 87,01% and 92,68% in comparison with other sequences of this same gene reported in USA, United Kingdom and Spain. This is the first TVP report in Brazil and supports CPNV as the etiologic agent of TVP. Even so, more studies on the effects of the disease in productivity and coinfections are required to improve the comprehension of TVP.

Key words: TVP, CPNV, birnavirus, histopathology, RT-PCR.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Macroscopia do proventrículo	38
Figura 2. Histopatologia do proventrículo	41
Figura 3. Árvore filogenética.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Escores de lesão para avaliação histopatológica do proventrículo de acordo com natureza, distribuição e intensidade do processo.....	31
Tabela 2: Ocorrência de lesões anatomopatológicas considerando o total de aves de lotes com suspeita de TVP e aves com lesão histológica no proventrículo e positivas na RT-PCR	39
Tabela 3: Associação entre escore do proventrículo, macroscopia e RT-PCR	41
Tabela 4: Histopatologia e ocorrência das lesões na submucosa dos proventrículos	42
Tabela 5: Associação entre diagnósticos histopatológicos sugestivos de lesões concomitantes em todas as aves examinadas e escore dos proventrículos.....	43

LISTA DE TABELA-GRÁFICOS

Tabela-Gráfico 1: Associação entre escore do proventrículo, idade e RT-PCR	36
Tabela-Gráfico 2: Associação entre escore do proventrículo, RT-PCR e diferença média entre peso vivo e o padrão Cobb* (kg).....	36

LISTA DE ABREVIATURAS

ARV – *Avian Reovirus*

CAV – *Chicken anemia virus*

CD (3, 4, 8) – *Cluster of differentiation*

CPNV – *Chicken proventricular necrosis virus*

DNA – *Desoxyribonucleic Acid*

Dpi – *Dias pós infecção*

EDTA – *Ethylenediamine tetraacetic acid*

GyV3 – *Gyrovirus 3*

IBD – *Infectious bursal disease*

IBDV – *Infectious bursal disease virus*

IBV – *Infectious bronchitis virus*

IFA – *Imunofluorescência*

IgG – *Imunoglobulina G*

IHQ – *Imuno-histoquímica*

ME – *Microscopia eletrônica*

NCBI – *National Center for Biotechnology Information*

NDV – *Newcastle disease virus*

NJM – *Neighbor-Joining method*

RNA – *Ribonucleic Acid*

RpRd – *RNA-Dependent RNA polymerase*

RT-PCR – *Reverse Transcription-Polimerase Chain Reaction*

RT-qPCR – *Reverse transcription polymerase chain reaction quantitative real time*

SPF – *Specific Pathogen Free*

THV – *Turkey hepatitis virus*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS GERAIS	13
3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
4. REVISÃO DE LITERATURA	14
4.1. Função, anatomia e histologia do proventrículo.....	14
4.2. Histórico.....	15
4.3. Etiologia.....	18
4.4. Ocorrência, sinais clínicos e epidemiologia.....	19
4.5. Imunidade.....	19
4.6. Macroscopia	20
4.7. Microscopia.....	21
4.8. Microscopia eletrônica.....	22
4.9. Imuno-histoquímica e imunofluorescência	23
4.10. Detecção molecular viral em aves com TVP	24
4.11. Sorologia e isolamento viral.....	24
4.12. Diagnóstico diferencial	25
5. MATERIAL E MÉTODOS	27
5.1. Características das granjas e histórico	28
5.2. Amostragem, macroscopia e histopatologia.....	28
5.3. Reação em Cadeia pela Polimerase via Transcriptase Reversa (RT-PCR).....	31
5.4. Sequenciamento.....	33
5.5. Análise estatística	34
6. RESULTADOS	34
6.1. Idade, mortalidade e peso.....	34

6.2.	Macroscopia	37
6.3.	Microscopia.....	39
6.4.	Detecção molecular e sequenciamento	43
7.	DISCUSSÃO	46
8.	CONCLUSÃO.....	51
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
10.	ANEXOS	57
10.1.	Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG (CEUA).....	57
10.2.	Termo de consentimento e sigilo livre esclarecido.....	58

1. INTRODUÇÃO

A proventriculite viral transmissível (TVP, do inglês, *transmissible viral proventriculitis*), é uma doença emergente, de etiopatogenia pouco conhecida que acomete principalmente frangos de corte (Pantin-Jackwood et al., 2005). A TVP resulta em aumento da espessura da parede do proventrículo (Bayyari et al., 1996; Guy et al., 2011b; Allawe et al., 2017), e no exame histopatológico caracteriza-se por lesões de necrose, infiltrado inflamatório e metaplasia das células epiteliais glandulares por epitélio ductal (Bayyari et al., 1996; Pantin-Jackwood et al., 2005; Grau-Roma et al., 2016).

Inicialmente a TVP foi associada a outras doenças como a síndrome da má absorção (Page et al., 1982), intoxicação por sulfato de cobre (Jensen et al., 1991) e doença infecciosa da bolsa cloacal (IBD, do inglês, *Infection Bursal Disease*) (Pantin-Jackwood e Brown, 2003). No entanto, pesquisas demonstraram que se tratava de uma doença de etiologia própria. Um vírus com características morfológicas de adenovírus denominado R11/3 foi isolado de frangos de corte com TVP, inoculado em aves SPF (do inglês, *Specific Pathogen Free*) reproduzindo a doença (Guy et al., 2007). Posteriormente, o vírus passou a ser identificado como vírus da proventriculite viral necrótica (CPNV, do inglês, *Chicken Proventricular Necrosis Virus*) e análises físicas e genômicas definiram o agente como um birnavírus, caracterização que permanece atualmente (Guy et al., 2011a). Porém, ainda há dúvidas sobre o papel de outros agentes na TVP pelo aumento de severidade da doença na associação do CPNV com excesso de sulfato de cobre (Bayyari et al., 1996), vírus da doença infecciosa da bolsa cloacal (IBDV, do inglês, *Infection Bursal Disease Virus*) (Pantin-jackwood et al., 2004b) e *Clostridium* spp. (Huff et al., 2001).

TVP possui implicações econômicas pois, pode haver aumento nos custos de produção pela piora de índices zootécnicos em lotes acometidos (Bayyari et al., 1995; Goodwin et al., 1996; Guy et al., 2005; Kim et al., 2015) e pela ocorrência de aves refugo (Noiva et al., 2015). Após o primeiro isolamento do agente em 2005 (Guy et al., 2005), a TVP foi relatada diversas vezes em diferentes partes do mundo (Guy et al., 2007; Noiva et al, 2015; Li et al. 2018), no entanto, não foram encontrados relatos da doença no Brasil.

2. OBJETIVOS GERAIS

Objetivou-se investigar a suspeita de TVP no Brasil em lotes de frangos de corte naturalmente infectados por análise histopatológica, identificação da etiologia por RT-PCR e caracterização filogenética do gene VP1 do CPNV.

3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar os aspectos referentes a morbidade, idade, peso e condições de manejo em frangos de uma granja com episódios naturais de TVP;
- Avaliar e descrever os sinais clínicos das aves acometidas por TVP;
- Avaliar e descrever macroscopicamente o proventrículo e demais órgãos com lesões;
- Realizar exame histopatológico detalhado do proventrículo para caracterizar o tipo, a distribuição e a intensidade das lesões;
- Implementar a detecção de RNA por RT-PCR para detecção e sequenciamento;
- Confirmar a etiologia da infecção viral na mucosa via RT-PCR e correlacioná-la com a lesão para diferenciar a possibilidade de proventrículos infectados sem lesão (potenciais portadores sadios);
- Determinar por histopatologia a possibilidade da ocorrência de coinfeções;
- Analisar estatisticamente a associação entre lesão histopatológica no órgão, detecção molecular do agente e diferença média entre peso vivo e peso padrão da linhagem *Cobb* (kg), afim de estabelecer a relação entre a TVP e perdas econômicas.

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1. Função, anatomia e histologia do proventrículo

Proventrículo é o estômago glandular das aves localizado posterior ao ingluvío (papo) e anterior ao ventrículo (moela), sendo o proventrículo e o ventrículo separados pelo istmo gástrico (Kutkat et al., 2010; Noiva et al., 2015). Sua função é de secretar ácido hidroclorídrico, pepsina e outras enzimas (Noiva et al., 2015). Histologicamente, o proventrículo é dividido em mucosa, submucosa, camadas musculares e serosa. A mucosa (túnica mucosa) apresenta dobras e sulcos em direção ao lúmen de diferentes tamanhos. O epitélio da superfície é colunar e cuboidal na base

dos sulcos (Khadim et al., 2011; Zhang et al., 2016). As células possuem núcleo basal e grânulos mucinosos supranucleares (visíveis no tricrômico de Masson e Gomori). Na lâmina própria da mucosa, há glândulas tubulares simples que excretam mucina neutra além de células similares à da superfície e tecido linfoide associado. Subjacente à mucosa há uma camada longitudinal muscular (lâmina muscular da mucosa) (Khadim et al., 2011). Ocupando a maior parte da parede do proventrículo está a submucosa, formada por lóbulos glandulares cônicos ou arredondados separados por tecido conjuntivo bem vascularizado. Os lóbulos possuem unidades túbulo-alveolares de células secretoras justapostas cúbicas e colunares, baixas e de aparência dentada (Khadim et al., 2011; Zhang et al., 2016). Estas células, denominadas de células oxínticopépticas, são semelhantes às células principais e parietais de mamíferos e são responsáveis por excretar ácido hidroclorídrico e pepsinogênio (Zhang et al., 2016). Os túbulos coletores e ductos excretores das glândulas são formados por epitélio colunar alto possuindo algumas células glandulares semelhantes as células presentes no alvéolo. Além disso, há uma camada serosa de tecido conjuntivo denso e duas camadas musculares, uma interna circular espessa e outra delgada longitudinal externa (Khadim et al., 2011). Nódulos linfoides multifocais são comuns nas glândulas da submucosa e na lâmina própria da mucosa do proventrículo (Pantin-Jackwood et al., 2004a; Guy et al., 2007).

4.2. Histórico

Relatos de proventrículo aumentado foram inicialmente descritos não necessariamente associados a TVP. As primeiras descrições foram relacionadas a dietas com proteínas purificadas (Newberne et al., 1956), adição de histamina (Shifrine et al., 1960) e fibra de baixa qualidade (Kubena et al., 1974; Riddell, 1976). O primeiro relato de proventriculite de origem infecciosa foi documentado em 1978 e ocorreu nos Países Baixos. As aves tinham histórico de conversão alimentar ruim, fezes mal digeridas e aumento do proventrículo. A doença foi então reproduzida com sucesso, inoculando-se por via oral, o macerado de proventrículos de frangos doentes. Macroscopicamente, o proventrículo estava aumentado com conteúdo rico em fibras no lúmen. Microscopicamente, havia infiltrado linfocitário nas glândulas e na mucosa, ocasionais áreas de fibrose e hemorragia. *E. coli* e adenovírus foram isolados do filtrado destes proventrículos (Kouwenhoven et al., 1978).

Vários casos com aumento do proventrículo foram relatados neste período com o acometimento também de outros órgãos (Page et al., 1982; Bracewell e Randall, 1983; Brugh e Wilson, 1986; Shapiro e Nir, 1995). Neste momento, a alteração no proventrículo foi determinada como parte de uma síndrome, denominada de diversas formas tais como síndrome da má absorção (Page et al., 1982), refugagem (Bracewell e Randall, 1983; Brugh e Wilson, 1986; Shapiro e Nir, 1995) e definhamento (Kouwenhoven et al., 1986). No entanto, não houve identificação *in situ* de nenhum agente no proventrículo destas aves (Page et al., 1982; Bracewell e Randall, 1983; Brugh e Wilson, 1986; Shapiro e Nir, 1995). Além disso, a síndrome afetava aves mais jovens, com pelo menos quatro dias (Kouwenhoven et al., 1986; Apple et al., 1991). Posteriormente, em 1986, Kouwenhoven e colaboradores afirmaram que a proventriculite não fazia parte da síndrome e deveria ser considerada causa distinta de refugagem em frangos de corte (Kouwenhoven et al., 1986).

Em 1991, casos em frangos comerciais com histórico de alta conversão alimentar, fezes mal digeridas e aumento do proventrículo foram relatados em Arkansas/EUA (Apple et al., 1991). Relatos semelhantes continuaram ocorrendo nesse Estado, com a descrição de frangos com proventrículo aumentado, serosa moteada com áreas esbranquiçadas e o istmo gástrico flácido. Microscopicamente, o proventrículo dessas aves apresentava infiltrado linfocitário na mucosa, glândulas da submucosa e interstício, necrose de epitélio tubular e metaplasia ductal. Lesões similares foram então reproduzidas por inoculação, em aves saudáveis, do macerado dos proventrículos dos frangos doentes (Bayyari, 1995). Neste mesmo período, estudos com cobre foram realizados comprovando o efeito tóxico de sulfato de cobre no proventrículo (Jensen et al., 1991). Como o cobre era rotineiramente adicionado a ração das aves da região como promotor de crescimento, suspeitava-se da sua possível associação com a doença, porém, foi observado que ele não reproduzia a doença, mas aumentava sua severidade quando doses altas eram adicionadas em dietas de aves com proventriculite (Bayyari et al., 1996; Wideman et al., 1996).

Ainda em 1996, foram identificadas, pela técnica de microscopia eletrônica, partículas virais no núcleo e citoplasma de células do epitélio glandular do proventrículo de aves com sinais macroscópicos e microscópicos (Goodwin et al., 1996) característicos da doença (Bayyari, 1995). Os autores sugeriram que as partículas virais, pela forma hexagonal, se assemelhavam a adenovírus, poliomavírus ou birnavirus. No entanto, a hibridização *in situ* não detectou adenovírus ou poliomavírus (Goodwin et al., 1996). A partir desta data, a doença foi considerada de etiologia própria e o termo proventriculite viral transmissível (TVP) foi determinado para essa condição (Goodwin e Hafner, 1997).

Neste período, frangos de abatedouros do estado do Arkansas com sinais de TVP e atrofia da bolsa cloacal apresentaram altos títulos de anticorpos contra IBDV (Bayyari et al., 1995; Bayyari et al., 1996). Então, utilizando o mesmo homogenado do proventrículo destas aves (Bayyari et al., 1995; Bayyari et al., 1996), diversas pesquisas buscaram relacionar o IBDV como possível agente da TVP (Bayyari et al., 1995; Bayyari et al., 1996; Huff et al., 2001; Pantin-Jackwood e Brown, 2003). No entanto, posteriormente foi comprovado que este homogenado estava contaminado com IBDV (Huff et al., 2001; Pantin-jackwood et al., 2005) e que o vírus não causava a TVP (Huff et al., 2001; Sellers et al., 2001; Pantin-Jackwood e Brown, 2003; Pantin-jackwood et al., 2004b; Guy et al., 2011a) mas que apenas poderia aumentar a severidade da doença quando presente (Pantin-jackwood et al., 2004b).

Por vários anos, diferentes tipos de vírus foram identificados no proventrículo de aves com a doença, no entanto, os pesquisadores não reproduziam a TVP em aves SPF com os vírus isolados (Goodwin et al., 1996; Lenz et al., 1998; Huff et al., 2001; Pantin-jackwood et al., 2005). Então, em 2005 um vírus RNA, denominado R11/3, foi isolado de aves com TVP e inoculado, via líquido amniótico, em ovos embrionados SPF levando a proventriculite. Partículas virais foram identificadas no núcleo de células acometidas das glândulas da submucosa. Essas partículas possuíam estruturas morfológicas de adenovírus, sendo então considerado como adenovírus-like (Guy et al., 2005). Em 2007, o vírus R11/3 foi inoculado via ocular em aves SPF e a TVP foi reproduzida experimentalmente. O vírus foi novamente identificado como adenovírus-like pelas características estruturais, no entanto, não foram observadas estruturas de superfície características da família *Adenoviridae* (Guy et al., 2007). Em reconhecimento ao seu principal sítio (proventrículo), o R11/3 foi então denominado como *Chicken Proventricular Necrosis Virus* (CPNV). O CPNV foi considerado como adenovírus-like até 2011, quando então foram analisadas as características físicas e genômicas do vírus, demonstrando que se trata de um birnavírus (Guy et al., 2011a). Neste mesmo período um vírus IBDV-like foi identificado no citoplasma e núcleo das glândulas do proventrículo de aves com TVP, utilizando microscopia eletrônica e imuno-histoquímica (Grau-Roma et al., 2010).

Nos últimos 10 anos, diversos relatos de casos com lesões características de TVP foram documentados, identificando nestas aves diferentes agentes, principalmente o CPNV (Guy et al., 2011b; Marguerie, et al., 2011; Marusak et al., 2012; Noiva et al., 2015; Grau-Roma et al., 2016; Allawe et al., 2017), mas também o IBDV (Grau-Roma et al., 2010; Kutkat et al., 2010), um novo picornavírus (Kim et al., 2015) e o Gyrovirus 3 (GyV3) (Li et al., 2018).

4.3. Etiologia

O agente da TVP é um birnavírus denominado como vírus da proventriculite necrótica das aves (CPNV), cujo período de incubação foi de três dias em aves infectadas experimentalmente (Guy et al., 2011a; Guy et al., 2011b). Este é um vírus RNA de cadeia dupla com duas bandas equimolares de aproximadamente 3,4 a 3,8 pares de kilobase, bissegmentado, icosaédrico, com tamanho de aproximadamente 75 nm e ausência de envelope lipídico. Características físicas e sequenciamento genômico parcial determinaram o CPNV como um birnavírus. A análise filogenética baseada nos genes que codificam a RNA polimerase RNA dependente (RpRd) é também uma forma utilizada para identificar e classificar vírus RNA. A região conservada no gene VP1 do CPNV identificada como subdomínio do RdRp, contém sequência de *motifs* descritos para RdRps de birnavírus e possui o arranjo de sequência permutada (C-A-B) característico de birnavírus. No entanto o CPNV tem tamanho e comprimento superior a outros birnavírus que variam geralmente entre 30 a 40 nm, e segmentos de RNA com menos de três kpb. Além disso, o sequenciamento do gene que codifica a proteína VP1 difere de outros birnavírus (Guy et al., 2011a). Após sua identificação, outros estudos encontraram esse vírus no proventrículo de aves com TVP (Marguerie, et al., 2011; Marusak et al., 2012; Noiva et al., 2015; Grau-Roma et al., 2016; Allawe et al., 2017). No entanto, em um estudo com frangos de corte e poedeiras com proventriculite, identificou-se por análise metagenômica, alta prevalência de um picornavírus no proventrículo dessas aves (ordem Picornavirales, família Picornaviridae, gênero *Megrivirus*) homólogo ao vírus da hepatite dos perus (THV, do inglês *turkey hepatitis virus*) (Kim et al., 2015). Em outro estudo, também com frangos de corte com sinais de TVP, um Gyrovirus 3 (GyV3) foi identificado por PCR. O GyV3, da família *Anelloviridae* (Li et al., 2018), é um vírus semelhante ao CAV (do inglês, *Chicken anemia virus*) (Rijsewijk et al., 2011). O CPNV não foi identificado nas amostras de proventrículo no referido estudo (Li et al., 2018). No entanto, não foram realizados ensaios para reprodução experimental da TVP e/ou identificação *in situ* para associar os agentes à lesão histológica (Kim et al., 2015; Li et al., 2018).

É possível que a associação do CPNV com outros agentes seja responsável pela TVP, ou que a associação de agentes pode agravar sinais da doença (Pantin-jackwood et al., 2005). IBDV (Pantin-jackwood et al., 2004b; Noiva et al., 2015) e *Clostridium* spp. (Huff et al., 2001) por exemplo, aumentam a severidade de TVP quando presentes. Além disso, alguns casos experimentais não tiveram redução no ganho de peso quando o CPNV foi reinoculado, reforçando

a hipótese de que a doença causa lesão significativa quando associada a outros agentes (Guy et al., 2005; Guy et al., 2007).

4.4. Ocorrência, sinais clínicos e epidemiologia

A doença foi descrita em frangos de corte, matrizes pesadas e poedeiras (Marusak et al., 2012; Kim et al., 2015). Assim, foram diagnosticadas aves com TVP nos Estados Unidos (Bayyari et al., 1995; Goodwin et al., 1996; Guy et al., 2005; Guy et al., 2007), Países baixos (Kouwenhoven et al., 1978), Espanha (Grau-Roma et al., 2010), Egito (Kutkat et al., 2010), França (Marguerie et al., 2011), Romênia (Coman et al., 2011), Coréia do Sul (Kim et al., 2015), Reino unido (Grau-Roma et al., 2016), Iraque (Allawe et al., 2017), Polônia (Śmiałek et al., 2017) e China (Li et al., 2018). No entanto, não foram encontrados relatos da doença no Brasil.

Os sinais clínicos da doença são inespecíficos, com diminuição do ganho de peso, piora da conversão alimentar (Bayyari et al., 1996; Huff et al., 2001; Pantin-Jackwood et al., 2004a; Guy et al., 2005; Kutkat et al., 2010; Kim et al., 2015; Śmiałek et al., 2017), desuniformidade do lote (Bayyari et al., 1995; Kutkat et al., 2010; Noiva et al., 2015; Śmiałek et al., 2017), refugagem e ração má digerida ou não digerida nas fezes (Goodwin et al., 1996; Grau-Roma et al., 2010; Marguerie, et al., 2011; Allawe et al., 2017). Estes sinais podem estar relacionados à necrose que ocorre em grande parte das células secretoras de pepsinogênio e ácido hidrocloreídrico do proventrículo (Goodwin et al., 1996).

Relatos descreveram aumentos de 0,5 a 5% de mortalidade semanal em aves com TVP (Marguerie, et al., 2011; Grau-Roma et al., 2010; Noiva et al., 2015) e acumulada de 3,03 a 4,49% (Grau-Roma et al., 2016). A idade de acometimento é ainda inespecífica, no entanto, a doença foi identificada em matrizes e poedeiras entre nove a vinte semanas (Marusak et al., 2012) e frangos entre 18 a 31 dias (Bayyari et al., 1996; Grau-Roma et al., 2010; Guy et al., 2011b, Noiva et al., 2015; Allawe et al., 2017; Śmiałek et al., 2017; Li et al., 2018).

A via de infecção natural é ainda desconhecida, mas a doença já foi reproduzida por inoculação do vírus por via oral (Huff et al., 2001; Pantin-Jackwood et al., 2005), ocular (Guy et al., 2005; Guy et al., 2007; Guy et al., 2011b) e líquido amniótico (Guy et al., 2005).

4.5. Imunidade

Linfócitos T e B estão presentes na lâmina própria assim como no epitélio glandular de proventrículos normais. Linfócitos T estão mais presentes no interstício e individualizados no epitélio, e os linfócitos B, são identificados especialmente nos agregados linfóides das glândulas (Pantin-Jackwood et al., 2004a). Durante o curso da TVP há maior presença de linfócitos T o que indica que a imunidade celular é mais importante (Pantin-Jackwood et al., 2004a; Pantin-Jackwood et al., 2004b). Linfócitos T permanecem na lâmina própria da mucosa em partes profundas da glândula durante todo o curso da doença. Linfócitos B assim como os linfócitos T localizam-se na lâmina própria no início da TVP, mas em menor quantidade. Com a progressão da doença, ocorre a formação de agregados linfocitários (com centros germinativos) na lâmina própria e epitélio glandular da submucosa, sendo então circundados por linfócitos T (Pantin-Jackwood et al. 2004a). Linfócitos B tem papel importante no início da TVP pois a redução na quantidade dos linfócitos nessa fase leva a queda na produção de anticorpos e consequente maior intensidade do aumento do espessamento do proventrículo. Além disso, aves com supressão de linfócitos T apresentam maior severidade da doença (Pantin-Jackwood et al., 2004b).

Linfócitos T CD3, CD4 e CD8 fazem parte da resposta inflamatória contra a TVP. Linfócitos CD3 são compartilhadores de antígeno e linfócitos CD4 são linfócitos T auxiliares (ativam linfócitos B). Linfócitos T CD4 e CD8 são identificados por imuno-histoquímica na mucosa da lâmina própria sete dpi (dias após a infecção), sendo o primeiro, presente em maior quantidade nessa etapa. Linfócitos CD8 estão mais presentes em glândulas com necrose aguda. Entre 14 e 21 dpi, estes linfócitos estão bem distribuídos na mucosa e infiltrando a glândula nos espaços intraepiteliais. Os linfócitos CD4 são os mais abundantes na fase inicial da doença e são encontrados circundando e infiltrando agregados de linfócitos B e profundamente no interstício das glândulas da submucosa. Linfócitos T CD3 permanecem durante a resposta inflamatória no interstício da lâmina própria e entre as células epiteliais glandulares (Pantin-Jackwood et al., 2004a).

A imunoglobulina G (IgG) anti-CPNV foi utilizada para a técnica de imunofluorescência do proventrículo de frangos com TVP. O antígeno foi identificado no citoplasma de células epiteliais glandulares em glândulas alteradas (Pantin-Jackwood et al., 2005).

4.6. Macroscopia

A principal alteração macroscópica da TVP é o aumento de espessura da parede do proventrículo. Geralmente o aumento da espessura pode aparecer aos 7 dpi (Pantin-Jackwood et al., 2004a; Guy et al., 2005; Guy et al., 2007; Guy et al., 2011b). Entre o sétimo e o décimo quarto dpi outras alterações podem ocorrer (Guy et al., 2005; Guy et al., 2007) como palidez da serosa (Bayyari et al., 1996; Guy et al., 2005; Marguerie et al., 2011; Noiva et al., 2015), áreas esbranquiçadas de padrão reticulado na serosa (Bayyari et al., 1996; Pantin-Jackwood et al., 2004b; Guy et al., 2007; Noiva et al., 2015) e submucosa do órgão (Goodwin et al., 1996; Pantin-Jackwood et al., 2005), dilatação das glândulas da submucosa (Guy et al., 2005; Guy et al., 2007) e distensão do istmo gástrico (Pantin-Jackwood et al., 2004a). Além disso, há descrição de achatamento (Bayyari et al., 1996; Pantin-Jackwood et al., 2004b), ou aumento (Li et al. 2018) das papilas da mucosa, secreção de fluido branco no lúmen (Pantin-Jackwood et al., 2004b), úlceras (Grau-Roma et al., 2010), áreas hemorrágicas na mucosa (Śmiałek et al., 2017) e ração mal digerida no lúmen (Noiva et al., 2015).

Outra alteração importante descrita em alguns casos de TVP é flacidez e dilatação do istmo gástrico que conecta o proventrículo com o ventrículo (Bayyari et al., 1996; Huff et al., 2001; Pantin-Jackwood et al., 2004b; Pantin-Jackwood et al., 2005; Kutkat et al., 2010; Coman et al., 2011).

Com relação ao curso da doença, dados experimentais indicam que as alterações macroscópicas iniciam-se sete dias após a infecção, com aumento acentuado do tamanho do proventrículo (Pantin-Jackwood et al., 2004a; Guy et al., 2005; Guy et al., 2007; Guy et al., 2011b). Entre o sétimo e o décimo quarto dia após a infecção a serosa torna-se pálida, há o aparecimento de áreas moteadas branco-acinzentadas. Ao corte, as glândulas estão dilatadas (Guy et al., 2005; Guy et al., 2007) e o istmo gástrico se distende (Pantin-Jackwood et al., 2004a). Aproximadamente aos vinte e um dias do curso da doença, o órgão retorna a sua coloração normal, mas o seu aumento é ainda presente, porém, em menor proporção (Pantin-Jackwood et al., 2004a; Guy et al., 2007). A inoculação do CPNV *in ovo* aos 15 dias de incubação leva ao aumento do proventrículo, identificado quando examinado aos dois dias de idade (Guy et al., 2005).

4.7. Microscopia

Quando há suspeita de TVP, o proventrículo deve ser coletado para histopatologia, sendo as lesões microscópicas detectadas entre cinco a 35 dpi (Guy et al., 2011b). Microscopicamente, as alterações comumente encontradas são necrose do epitélio glandular, hiperplasia do epitélio ductal e substituição do epitélio glandular por epitélio ductal (metaplasia), além de expansão do interstício glandular por infiltrado de linfócitos (Bayyari et al., 1995; Goodwin et al., 1996; Kutkat et al., 2010; Coman et al., 2011; Guy et al., 2011b; Marguerie et al., 2011; Allawe et al., 2017; Śmiałek et al., 2017). As células do epitélio glandular da submucosa quando degeneradas, apresentam núcleo aumentado e fracamente basofílico com a cromatina deslocada para a periferia (Pantin-Jackwood et al., 2004a; Guy et al., 2005; Pantin-Jackwood et al., 2005). Pode haver dilatação das glândulas (Pantin-Jackwood et al., 2004a; Guy et al., 2007; Coman et al., 2011). Nódulos linfóides presentes no proventrículo tendem a aumentar de tamanho com a progressão da doença (Guy et al., 2007).

Até os sete dias já ocorre necrose do epitélio glandular, com início nas células da região da papila (Pantin-Jackwood et al., 2004a; Pantin-Jackwood et al., 2004b; Guy et al., 2005; Pantin-Jackwood et al., 2005; Guy et al., 2007a; Guy et al., 2011b). Aos sete e 14 dpi é visualizado infiltrado inflamatório linfocitário (Pantin-Jackwood et al., 2004a; Pantin-Jackwood et al., 2004b) podendo este ocorrer na lâmina própria, epitélio glandular e interstício (Pantin-Jackwood et al., 2004a). A metaplasia ductal é mais tardia, com cerca de 14 a 21 dpi com substituição do epitélio glandular por epitélio ductal hiperplásico e hipertrófico (Pantin-Jackwood et al., 2004a; Pantin-Jackwood et al., 2004b; Pantin-Jackwood et al., 2005). Após 21 dias, a necrose no epitélio glandular diminui, mas ainda há formação de agregado linfocitário com centros germinativos nas glândulas acometidas (Pantin-Jackwood et al., 2004a). As lesões microscópicas podem se estender até 35 dpi (Guy et al., 2011b). O vírus pode ser detectado em proventrículos com infiltrado linfocitário e ausência de necrose em estágios mais avançados da doença (Grau-Roma et al., 2016).

4.8. Microscopia eletrônica

Diversos trabalhos realizaram microscopia eletrônica (ME) do epitélio glandular de aves com TVP. Miríades de partículas virais foram identificadas no núcleo e citoplasma variando entre 40 a 70 nm, de formato hexagonal (Goodwin et al., 1996). Vírus de tamanho superior (100 a 120 nm) foram identificados no núcleo, estes não envelopados, hexagonais e arranjados em ordem

semi paracristalina (Huff et al., 2001). Frangos inoculados com o mesmo homogenado utilizado por Huff e colaboradores (2001), desenvolveram a doença e partículas virais foram identificadas por ME no citoplasma das células. Estas mediam 120 nm, mas eram pleomórficas e envelopadas semelhantes ao coronavírus (Pantin-Jackwood et al., 2005). No entanto, vírus menores, de 70 nm e icosaédricos foram identificados no núcleo das células epiteliais glandulares do proventrículo de aves com TVP, sendo denominado de R11/3 e caracterizado como adenovírus-like (Guy et al., 2005). Partículas virais intracitoplasmáticas de 60 a 70 nm, não envelopadas foram também relatadas posteriormente (Grau-Roma 2010). O CPNV, considerado agente da doença, é caracterizado como icosaédrico de aproximadamente 75 nm e não envelopado (Guy et al., 2011a). Recentemente, em estudo experimental que detectou alta prevalência de picornavírus em aves com TVP, identificou também partículas de 60 a 62 nm, icosaédricas e não envelopadas (Kim et al., 2015).

4.9. Imuno-histoquímica e imunofluorescência

CPNV foi identificado pela imuno-histoquímica (IHQ) no citoplasma das células do epitélio glandular e da mucosa de frangos de corte com TVP (Noiva et al., 2015). IHQ realizada no proventrículo de frangos doentes, resultou em marcação positiva no citoplasma e núcleo das células oxintopépticas, utilizando anticorpo monoclonal para a proteína VPX do IBDV. No entanto, este anticorpo não marcou antígeno viral nas células da bolsa cloacal (Grau-Roma et al., 2010).

A imunofluorescência (IFA) foi utilizada em alguns estudos para o diagnóstico de TVP. A detecção do vírus pode ocorrer entre três a 10 dpi (Guy et al., 2011b). Em frangos, o vírus R11/3 foi identificado no núcleo das células do epitélio glandular da submucosa proventricular aos cinco, sete, 10 e 21 dpi. A imunomarcação foi identificada no epitélio ductal e na mucosa (Guy et al. 2005; Guy et al., 2007; Guy et al., 2011b). Na mucosa, a marcação foi observada entre três a cinco dpi (Guy et al., 2007). Imunomarcação por IFA foi, também, observada no proventrículo de pintos de dois dias de idade inoculados *in ovo* aos 15 dias de incubação (Guy et al., 2005). A marcação não identificou o vírus em ventrículo, pulmão, fígado, baço, rins, intestino, pâncreas ou bolsa cloacal (Guy et al., 2007). Aos três dpi, o vírus está presente no epitélio ductal glândular e da mucosa. Entre cinco a 10 dpi a marcação é identificada também nas glândulas da submucosa (Guy et al., 2011b).

4.10. Detecção molecular viral em aves com TVP

A RT-PCR tem sido uma das principais ferramentas para o diagnóstico da infecção, pois o vírus pode ser detectado entre três a 14 dpi (Guy et al., 2011b). O CPNV é identificado geralmente pela amplificação de um fragmento do gene VP1 de homogenado do proventrículo de aves com TVP (Guy et al., 2011a; Guy et al., 2011b; Marguerie, et al., 2011; Marusak et al., 2012; Grau-Roma et al., 2016; Allawe et al., 2017). Este vírus também foi identificado do tecido de proventrículo parafinizado (Pantin-Jackwood et al., 2005). Além da RT-PCR, RT-qPCR e metagenômica também foram realizadas em diversos frangos e poedeiras comerciais com sinais de TVP. Um novo picornavírus, semelhante ao vírus da hepatite dos perus, foi identificado em todas as aves. No entanto, CAV, parvovírus, astrovírus (também conhecido como avastrovírus e vírus da nefrite aviária), vírus da encefalite aviária, calicivírus e adenovírus também foram detectados por meio de metagenômica. O CPNV não foi pesquisado neste estudo, pois os pesquisadores não possuíam no banco de dados sequência similar ao birnavírus, o qual foi identificado por Guy e colaboradores em 2011 (Kim et al., 2015). Foi determinada a sensibilidade do RT-PCR para CPNV em um teste realizado em amostra sabidamente positiva em 10 diferentes diluições. A especificidade foi definida realizando RT-PCR de amostras com o CPNV e amostras com outros vírus. A sensibilidade e especificidade da RT-PCR foi respectivamente de 88,0% e 83,0% em proventrículo congelado e de 100,0% e 86,0% em proventrículo fixado em formalina e embebido em parafina (Guy et al., 2011b).

4.11. Sorologia e isolamento viral

O isolamento viral e a sorologia não são métodos muito utilizados para o diagnóstico de TVP, especialmente se não forem utilizados em associação com a histopatologia. Estes métodos foram empregados em aves SPF e frangos comerciais, aos zero e 21 dpi por CPNV. No entanto, anticorpos não foram detectados (Guy et al., 2007). Anticorpos contra IBV (do inglês, *infectious bronchitis virus*), IBDV e ARV (do inglês, *Avian Reovirus*) foram detectados por meio de ELISA em aves com lesões macro e microscópicas de TVP (Kutkat et al., 2010).

O isolamento viral foi realizado utilizando o homogenado do proventrículo de aves SPF com cinco, sete e 14 dias após a infecção. O homogenado foi propagado em até oito passagens

em diversas culturas de células aviárias e de mamíferos, além de inoculado também em ovos embrionados via amniótica, membrana córioalantoide, alantoide e gema (Guy et al., 2005; Guy et al., 2007; Guy et al., 2011a, Guy et al., 2011b). A propagação causou alteração somente após quatro passagens por via amniótica. Na necropsia feita aos dois dias após a eclosão embrionária foram observados palidez e aumento do proventrículo. A presença do CPNV no proventrículo desses pintinhos foi confirmada por imunofluorescência indireta (Guy et al., 2005).

4.12. Diagnóstico diferencial

O aumento do proventrículo associado ou não a proventriculite foi atribuído a diversas causas. Rações mal balanceadas podem levar ao aumento do proventrículo por distensão. Dietas com baixo percentual de fibra levam ao aumento do órgão (Kubena et al., 1974; Riddell, 1976; Taylor e Jones, 2004). No entanto, esse aumento ocorre pela dilatação do órgão e não por hipertrofia epitelial e inflamação (Riddell, 1976). Atualmente, o cobre é utilizado nas rações como suplemento mineral e não mais como promotor de crescimento. O uso de sulfato de cobre na ração em altas doses (acima de 200 ppm) pode levar a necrose do proventriculo (Jensen et al., 1991; Bayyari et al., 1996; Wideman et al., 1996), podendo haver áreas multifocais amarronzadas a pretas na superfície da mucosa (Jensen et al., 1991). Aminas biogênicas (histamina, cadaverina, putrescina, espermina e espermidina) são formadas pela descarboxilação microbial de aminoácidos (Barnes et al., 2001). A adição de pelo menos 0,1% de histamina pode levar ao aumento do proventrículo (Shifrine et al., 1960; Brugh e Wilson, 1986; Barnes et al., 2001) por edema, consequência de distúrbios no sistema vascular (Shifrine et al., 1960). Em alguns casos pode levar ao aparecimento de placas esbranquiçadas na mucosa, achatamento das papilas gástricas (Barnes et al., 2001) e exsudação de fluído esbranquiçado das glândulas (Shifrine et al., 1960). Cadaverina também pode levar a distensão do proventrículo (Barnes et al., 2001).

A presença a partir de 200 µg/g de oosporeina a ração leva ao aumento da mortalidade de frangos de corte. A oosporeina, produzida por espécies de fungos do gênero *Chaetomium*, pode levar a lesões em diversos órgãos e ao aumento do proventrículo com o acúmulo de exsudato sobre a mucosa e erosões, principalmente no istmo (Pegram e Wyatt, 1981). Outra micotoxina responsável por causar aumento do proventrículo é o ácido ciclopiazônico, produzido pelo *Aspergillus flavus*. Quando adicionado na proporção de pelo menos 50 µg/g na ração, ocorre

aumento da espessura da parede do proventrículo devido a erosões, úlceras, hiperemia e excesso de produção de muco. Contudo, essas lesões ocorrem na mucosa superficial (Dorner et al., 1983).

O proventrículo de aves de produção também é susceptível a parasitoses. *Cryptosporidium* pode levar a infiltrado linfocitário heterofílico quando coloniza o epitélio do órgão. Os coccídeos são facilmente identificados pela histopatologia na borda apical das células mucosas (Goodwin, 1995). *Ascaridia galli* pode causar aumento do proventrículo por hemorragias e úlceras na mucosa (Brar et al., 2016). *Macrorhabdus ornithogaster*, mais comum em psitacídeos e passeriformes, pode levar a proventriculite linfoplasmocitária em aves comerciais. Este agente é facilmente identificado por histopatologia e colorações especiais (Phalen e Moore, 2003).

Frangos de corte com vírus da reticuloendoteliose podem apresentar lesões microscópicas com hemorragia, úlceras, dilatação cística glandular e infiltrado mononuclear neoplásico na submucosa do proventrículo (Jackson et al., 1977).

IBDV, também um birnavirus, foi sugerido por anos como um dos possíveis agentes da TVP (Bayyari et al., 1995; Bayyari et al., 1996). No entanto, o vírus não foi identificado no proventrículo de aves com TVP em vários estudos (Huff et al., 2001; Pantin-Jackwood e Brown, 2003; Pantin-Jackwood et al., 2004b; Guy et al., 2005; Guy et al., 2011a; Guy et al., 2011b). Estirpes vacinais (Delaware A-1084, D78 e BursaVac) também não foram identificadas em aves vacinadas contra IBD (Sellers et al., 2001). Quando inoculado em aves SPF, a proventriculite não foi reproduzida (Pantin-Jackwood e Brown, 2003; Pantin-Jackwood et al., 2004b). No entanto, a IBD pode aumentar a severidade ou a ocorrência de TVP agindo como imunodepressor (Pantin-jackwood et al., 2004b; Noiva et al., 2015). Experimentos no Egito em frangos encontraram relação entre a lesão e o IBDV. Foram identificados IBDV, IBV e ARV, pela RT-PCR, no proventrículo de aves com lesões macro e microscópicas de TVP (Kutkat et al., 2010). Além disso, a inoculação da estirpe vvIBDV em frangos levou a proventriculite, no entanto, a lesão limitou-se apenas a mucosa do órgão (Elkady et al., 2009). É provável que as aves que geraram essas suspeitas possuíam também IBDV, porém, o vírus não causa TVP (Pantin-Jackwood e Brown, 2003; Pantin-jackwood et al., 2004b). Grau-Roma identificou um IBDV-like em aves com TVP (Grau-Roma et al., 2010)

IBV foi identificado em aves com TVP (Pantin-jackwood et al., 2005; Kutkat et al., 2010), sendo que algumas delas apresentavam também bronquite infecciosa (Pantin-jackwood et al., 2005). Na China, foram relatados surtos de doença com morbidade alta (30 a 60 %). As aves tinham aumento da espessura do proventrículo, sinais respiratórios e enterite. Estes frangos e

poedeiras eram vacinadas com H120 contra bronquite infecciosa. Além de aumento do proventrículo, havia excesso de fluído no lúmen e aparente hemorragia na mucosa. Três estirpes de IBV foram isoladas dos proventrículos (Q1, J2 e T3) e a doença reproduzida em aves SPF pela inoculação via nasal de suspensões com as estirpes (Yu et al., 2001).

Adenovírus-like já foi identificado em aves com a doença (Goodwin et al., 1996, Guy et al., 2005). No entanto, aves com TVP foram negativas para Adenovírus tipo I (Guy et al., 2011b). Além disso, a inoculação de adenovírus isolado de frangos com sinais microscópicos de TVP levou apenas a hiperplasia linfoide em poedeiras SPF (Lenz et al., 1998).

O aumento do proventrículo foi relatado em casos de síndrome da refugagem e má absorção (Page et al., 1982; Bracewell e Randall, 1983; Brugh e Wilson, 1986; Shapiro e Nir, 1995). O principal agente identificado nesses casos foi o reovírus (Page et al., 1982; Bracewell e Randall, 1983; Brugh e Wilson, 1986), porém não houve identificação *in situ* de nenhum vírus no proventrículo destes casos (Page et al., 1982; Bracewell e Randall, 1983; Brugh e Wilson, 1986; Shapiro e Nir, 1995) e reovírus não foi detectado utilizando RT-PCR (Pantin-jackwood et al., 2005; Guy et al., 2011a; Guy et al., 2011b) ou IFA (Guy et al., 2005) nessas aves. Além disso, o reovírus isolado de aves com lesões microscópicas de TVP não causou a doença quando inoculado em poedeiras SPF (Lenz et al., 1998). No entanto, um relato no Egito identificou o reovírus aviário, pela RT-PCR, no proventrículo de aves com TVP (Kutkat et al., 2010), o que não confirma seu envolvimento na doença pois o vírus pode ser identificado no proventrículo de aves sem os sinais da doença (Lenz et al., 1998).

Um novo picornavírus foi identificado em 2015 em aves com lesões macroscópicas e microscópicas de TVP. No entanto, a identificação foi realizada por análise metagenômica do conteúdo do proventrículo dessas aves. A análise levanta uma suspeita, mas não determina um novo vírus como agente da TVP. Além disso, não foi pesquisado a presença do CPNV nestes casos (Kim et al., 2015). Outro vírus, GyV3, foi identificado por RT-PCR em frangos de corte com sinais de TVP (Li et al., 2018). Há relatos também de histiocitose idiopática levando ao aumento do proventrículo (Hafner et al., 1996).

A associação do CPNV com outros agentes etiológicos ou químicos pode aumentar a severidade da doença. É o caso do *Clostridium* sp. (Huff et al., 2001), IBDV (Pantin-jackwood et al., 2004b; Noiva et al., 2015) e sulfato de cobre (Bayyari et al., 1996; Wideman et al., 1996).

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Características das granjas e histórico

Foram examinadas 73 amostras incluindo 10 amostras do estudo retrospectivo e 63 amostras do estudo prospectivo. As 10 amostras do estudo retrospectivo foram obtidas entre 2013 a 2017. Estas amostras consistiam de proventrículos fixados em formalina 10% provenientes de frangos de lotes da região Sudeste e quatro proventrículos congelados a -80°C na forma de *pool* recebidos em 2017. Os frangos foram necropsiados nas granjas e encaminhados para diagnóstico histopatológico. Para o estudo prospectivo, 63 frangos foram encaminhados ao setor de Patologia da Escola de Veterinária da UFMG em dezembro de 2017. Os frangos de corte eram da linhagem *Cobb* e eram provenientes de uma mesma granja localizada na região Sudeste brasileira.

Todas as 73 aves examinadas eram de granjas de uma mesma região e consideradas de pequeno a médio porte com alojamentos que variavam entre 17.000 a 40.000 frangos em galpões convencionais e com nível de biossegurança limitada de acordo com veterinário responsável que não especificou as razões. Era feita vacinação no incubatório contra o vírus da doença de Marek, IBD e *Newcastle* causada pelo NDV (do inglês, *Newcastle disease virus*). Os lotes do estudo retrospectivo foram também vacinados contra IBV. Todas as aves enviadas eram de lotes com histórico recente de aumento da espessura da parede de proventrículos. As aves apresentaram atraso no desenvolvimento corporal e baixo peso. Os 63 frangos de corte do estudo prospectivo pertenciam a seis lotes mistos diferentes (A, B, C, D, E e F), correspondendo, respectivamente, a 10, 11, 10, 10, 10 e 12 frangos com idades de 36, 36, 28, 25, 27, e 33 dias. Foram selecionadas aves com sinais de atraso no desenvolvimento e baixo peso para a idade sendo estas oriundas de lotes onde já se havia sido constatado aumento da espessura de proventrículos. As 10 aves do estudo retrospectivo também pertenciam a lotes mistos e os frangos tinham entre 29 a 32 dias de idade.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG, com o número de protocolo 169/2017 (Anexo 10.1), juntamente com os termos de consentimento dos proprietários ou responsáveis pelas granjas (Anexo 10.2). As aves foram eutanasiadas por deslocamento cervical segundo as *Diretrizes* para eutanásia da Resolução 1000/2012 do CFMV.

5.2. Amostragem, macroscopia e histopatologia

Os frangos do estudo prospectivo foram pesados vivos e eutanasiados no setor de Patologia da Escola de Veterinária da UFMG para avaliação macroscópica e coleta das amostras. O peso (kg) de cada ave foi comparado ao sistema métrico de lote misto do *Cobb 500* (Cobb, 2015), sendo levado em consideração a idade de cada frango (Peso padrão por idade do sistema métrico de lote misto do *Cobb 500* – Peso ave viva = Diferença entre peso vivo e padrão *Cobb*). Durante o exame *post-mortem*, todos os proventrículos foram removidos e abertos longitudinalmente. Neste momento, a espessura da parede do proventrículo foi dimensionada em centímetros com uma régua. Em seguida secções do órgão foram coletadas em triplicatas e congeladas imediatamente em nitrogênio líquido para posterior extração do RNA. Para histopatologia foram feitos cortes longitudinais e transversais do proventrículo e fixados em formalina tamponada 10%. Amostras de laringe, traqueia, pulmão, ventrículo, intestino, pâncreas, bolsa cloacal, baço, timo, pulmão, coração, fígado e rins também foram coletados e fixados em formalina tamponada neutra 10% por no máximo 72 horas. Dentre as 10 amostras do estudo retrospectivo, quatro proventrículos haviam sido congelados a -80°C sem identificação o que impossibilitou associá-los aos respectivos casos sendo considerados apenas no total de amostras final da RT-PCR.

As amostras formalizadas foram processadas para histopatologia. No processamento, os tecidos foram desidratados em séries crescentes de etanol, diafanizados em xilol, incluídos em parafina para obtenção de cortes seriados à espessura de cinco micrômetros, corados pela técnica de Hematoxilina-Eosina (HE) (Luna, 1968) e analisados ao microscópio de luz comum. Para escore das lesões do proventrículo, foi selecionada uma secção transversal mais representativa das lesões e realizada a contagem do total de glândulas normais e glândulas com infiltrado inflamatório para cálculo do percentual de acometimento e conseqüentemente a distribuição da lesão. O infiltrado inflamatório na lâmina própria da mucosa não foi avaliado por ser considerado normal em aves saudáveis (Khadim et al., 2011). Foram considerados como nódulos linfóides ativados, áreas bem circunscritas e delimitadas com acúmulo de linfócitos e plasmócitos no interstício da submucosa. Para o escore foram determinados os seguintes critérios: normal (-), nódulos linfóides ativados multifocais a coalescentes discretos; positivo discreto (+), infiltrado intersticial linfo-histioplasmocitário multifocal a coalescente discreto afetando até 25% das glândulas com ou sem substituição de epitélio glandular multifocal a coalescente discreto. Pode haver também necrose de epitélio glandular multifocal a coalescente discreta, nódulos linfóides ativados multifocais a coalescentes discreto a acentuado, metaplasia ductal discreta a acentuada e ectasia de glândulas multifocal a coalescente discreta a acentuada; positivo moderado (++) infiltrado intersticial linfo-histioplasmocitário multifocal a coalescente moderado acometendo

entre 25% a 50% das glândulas com ou sem substituição de epitélio glandular multifocal a coalescente discreto ou moderado. Necrose do epitélio glandular multifocal a coalescente discreto ou moderado. Pode haver nódulos linfoides ativados multifocais a coalescentes discreto a acentuado, metaplasia ductal discreta a acentuada e ectasia de glândulas multifocal a coalescente discreta a acentuada; positivo acentuado (+++), infiltrado intersticial linfo-histioplasmocitário multifocal a coalescente moderado ou acentuado afetando acima de 50% das glândulas com substituição de epitélio glandular multifocal a coalescente moderado ou acentuado. Necrose de epitélio glandular multifocal a coalescente moderado ou acentuado. Pode haver metaplasia ductal discreta a acentuada e ectasia de glândulas multifocal a coalescente discreta a acentuada (Tabela 1).

Tabela 1: Escores de lesão para avaliação histopatológica do proventrículo de acordo com natureza, distribuição e intensidade do processo.

5.3. Reação em Cadeia pela Polimerase via Transcriptase Reversa (RT-PCR)

Os proventrículos das 63 aves recebidas em dezembro de 2017 foram coletados em triplicata (três fragmentos) utilizando lâminas de aço cirúrgico estéril descartável imediatamente após o início da necropsia, armazenados individualmente em microtubos translúcidos de

Alteração histopatológica	Escore proventrículo*			
	Normal (-)	Positivo discreto (+)	Positivo moderado (++)	Positivo acentuado (+++)
Nódulos linfoides ativados	Multifocais a coalescentes discretos	Presente/Ausente Multifocal a coalescentes discreto a acentuado	Presente/Ausente Multifocal a coalescentes discreto a acentuado	Presente/Ausente Multifocal a coalescentes discreto a acentuado
Infiltrado intersticial linfohistioplasmocitário	Ausente	Multifocal a coalescente discreto afetando até 25% das glândulas	Multifocal a coalescente moderado afetando entre 25% a 50% das glândulas	Multifocal a coalescente moderado ou acentuado afetando acima de 50% das glândulas
Substituição de epitélio glandular por infiltrado histiolinfoplasmocitário	Ausente	Presente/Ausente Multifocal a coalescente discreto	Presente/Ausente Multifocal a coalescente discreto ou moderado	Multifocal a coalescente moderado ou acentuado
Necrose do epitélio glandular	Ausente	Presente/Ausente Multifocal a coalescente discreto	Multifocal a coalescente discreto ou moderado	Multifocal a coalescente discreto ou acentuado
Ectasia glandular	Ausente	Presente/Ausente Multifocal a coalescente discreta a acentuada	Presente/Ausente Multifocal a coalescente discreta a acentuada	Presente/Ausente Multifocal a coalescente discreta a acentuada
Metaplasia ductal	Ausente	Presente/Ausente Multifocal a coalescente discreta a acentuada	Presente/Ausente Multifocal a coalescente discreta a acentuada	Presente/Ausente Multifocal a coalescente discreta a acentuada

*Foi selecionado de cada amostra um corte histológico mais representativo das lesões com contagem do total de glândulas normais e glândulas com infiltrado inflamatório para percentual de acometimento.

poliestireno *DNase* e *RNase free* e congelados em nitrogênio líquido. Para a extração de RNA total das amostras congeladas foi utilizado o protocolo com sílica e tampão de lise com guanidina (Boom et al., 1990). Além disso, quatro proventrículos do estudo retrospectivo armazenados a -80°C foram utilizados totalizando 67 RT-PCR realizados.

O RNA total extraído de cada amostra foi utilizado para subsequente Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) via Transcriptase Reversa (RT). Para a detecção e amplificação do gene VP1 do CPNV foram utilizados os oligonucleotídeos descritos por Guy et al. (2011a). Os primers (IDT®, EUA) foram produzidos de acordo com a sequência de pares de base de uma região do gene VP1 do CPNV, B2F (5-CGTAGACCTCGTCCTTCTGC-3) e B2R (5-GGGCGTAACCATTCAGATA-3) (Guy et al. 2011a).

Para extração de RNA total foram produzidos sílica, tampão de lise e de lavagem de acordo com Vogelstein and Gillespie (1979) e Boom et al. (1990). Cerca de 0,1 g de cada amostra de proventrículo foi seccionada milimetricamente em placa de Petri individual descartável com lâmina de aço cirúrgico estéril descartável. O material foi então depositado em microtubo translúcido de poliestireno *DNase* e *RNase free* com 700µl de tampão de lise e macerado com pistilos individuais. Em seguida cada amostra foi vortexada e centrifugada a 15.000 rpm a 7°C por 2 minutos. O sobrenadante foi pipetado para outro microtubo translúcido de poliestireno *DNase* e *RNase free* e adicionado 40µl de sílica. O microtubo foi vortexado, sedimentou por 10 minutos e vortexou novamente. Cada amostra foi então centrifugada a 15.000 rpm e 7°C por 1 minuto e o sobrenadante descartado. Por duas vezes, 600µl de tampão de lavagem foi adicionado, vortexado, centrifugado a 15.000 rpm e 7°C por 1 minuto e o sobrenadante descartado. 1ml de etanol 70% foi acrescentado (álcool etílico absoluto P. A. 99,8% Êxodo® diluído em água para injetáveis Linhamax®), então, vortexado, centrifugado a 15.000 rpm e 7°C por 1 minuto e o sobrenadante descartado. Este passo com etanol foi repetido uma vez e em seguida 1ml de acetona (HPLC 99,9%, Sigma®) foi depositado no microtubo novamente vortexada, centrifugada a 15.000 rpm e 7°C por 1 minuto e o sobrenadante descartado. As amostras foram centrifugadas novamente para descartar o restante do sobrenadante e repousaram abertas para secar por 15 minutos. Ao final da secagem, 45µl de tampão de eluição (solução na proporção de 20µl de RNAsin para cada 600µl de água para injetáveis Linhamax®) foi adicionada aos microtubos. Cada amostra foi incubada a 56°C por 15 minutos, centrifugada a 15.000 rpm e 7°C por 2 minutos e o sobrenadante pipetado em novo microtubo translúcido de poliestireno

DNase e RNase free para armazenamento a -80°C. Todas as amostras foram quantificadas e sua pureza avaliada utilizando o espectrofotômetro (Thermo Scientific®, NanoDrop 2000).

Cada amostra pura foi diluída em tampão de eluição produzindo cerca de 100ng de RNA total extraído. Foi utilizado o kit one step da Promega (Access RT-PCR system A1250, Promega®, Madison, EUA) para a reação de RT-PCR. As proporções de reagentes utilizados para a RT-PCR foram 9µl de Nuclease-Free Water, 5µl de AMV/tfl 5x Reaction Buffer, 0,5µl dNTP Mix (10mM/dNTP), 0,5µl AMV Reverse Transcriptase, 0,5µl Tfl DNA Polimerase, 1,5µl MgSO₄ (25mM), 1,5µl Forward Primer, 1,5µl Reverse Primer e 5µl de amostra diluída totalizando 25 µl. Foram utilizados os controles positivo e negativo do kit, e também produzido um controle positivo pelo sequenciamento de uma amostra positiva por RT-PCR obtida das aves desse estudo. Para o controle negativo foi acrescentando 5 µl de Nuclease-Free Water em substituição ao RNA.

As amostras foram colocadas em um termociclador por 45 minutos a 45°C e 2 minutos a 94°C. Em seguida 40 ciclos de desnaturação (1 minuto a 95 °C), anelamento (1 minuto a 55°C) e extensão (1 minutos a 72°C). Ao final dos 40 ciclos, mais 5 minutos a 72°C de extensão final e então resfriado a 4°C. O produto da amplificação 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 100V e 400mA por 70 minutos. A visualização dos fragmentos amplificados foi feita por transiluminação do gel em luz ultravioleta. O tamanho dos fragmentos amplificados (171 pb) foi comparado a um padrão de peso molecular (LowRanger 100bp DNA Ladder-Norgen®) disposto no gel juntamente com as amostras analisadas.

5.4. Sequenciamento

Foi realizado o sequenciamento do produto amplificado de cerca de 171 pares de bases (pb) de uma amostra para confirmação do gene VP1. Para o sequenciamento, os produtos amplificados de DNA foram extraídos e purificados da agarose utilizando o kit (Invisorb® Spin DNA *Extraction Kit*), conforme recomendações do fabricante. A amostra foi sequenciada nas direções *forward* e *reverse*, pelo método Sanger por eletroforese capilar utilizando o kit (ABI Taq DyeDeoxy Terminator versão 3.1 *Cycle Sequencing Kit*) de acordo com as instruções do fabricante (*Applied Biosystems, Inc., Foster City, California, USA*) em um sequenciador automático (ABI 3130 Genetic Analyzer). A reação de sequenciamento foi realizada com um passo inicial de desnaturação a 96°C por 1 minuto, 30 ciclos a 96°C por 15 segundos, 50° C por

15 segundos, 60°C por 4 minutos e resfriamento 8°C indefinidamente (Programa SeqDNA). A seguir, o produto desta reação foi precipitado com 40 µl de isopropanol a 65%, incubado à temperatura ambiente no escuro por 30 minutos e centrifugado a 14.000 rpm por 45 minutos. O sobrenadante foi removido, acrescentando-se 500 µL de etanol 60% (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha), subsequentemente centrifugado a 14.000 rpm por 10 minutos e desidratado do precipitado em estufa a 95°C por 5 minutos.

Com o uso do programa (*software*) SeqMan (versão 7.0), as sequências obtidas foram analisadas e refinadas obtendo-se sequências consenso. O programa Bioedit (versão 7.0.5) foi utilizado no alinhamento das sequências consenso com sequências colocadas na plataforma BLASTn, onde foram selecionadas sequências com similaridade de no mínimo 87%. A análise filogenética foi realizada pelo *software* MEGA versão 7.0,26 (Kumar *et al.*, 2016; Tamura, 1992). As sequências foram alinhadas pelo método *Neighbor-Joining* (NJ) (Saitou e Nei, 1987) e as distâncias evolutivas foram calculadas usando o método de *Maximum Likelihood* (Tamura, 1992) e agrupadas pelo método de *bootstrap* (1.000 réplicas) (Felsenstein, 1985).

5.5. Análise estatística

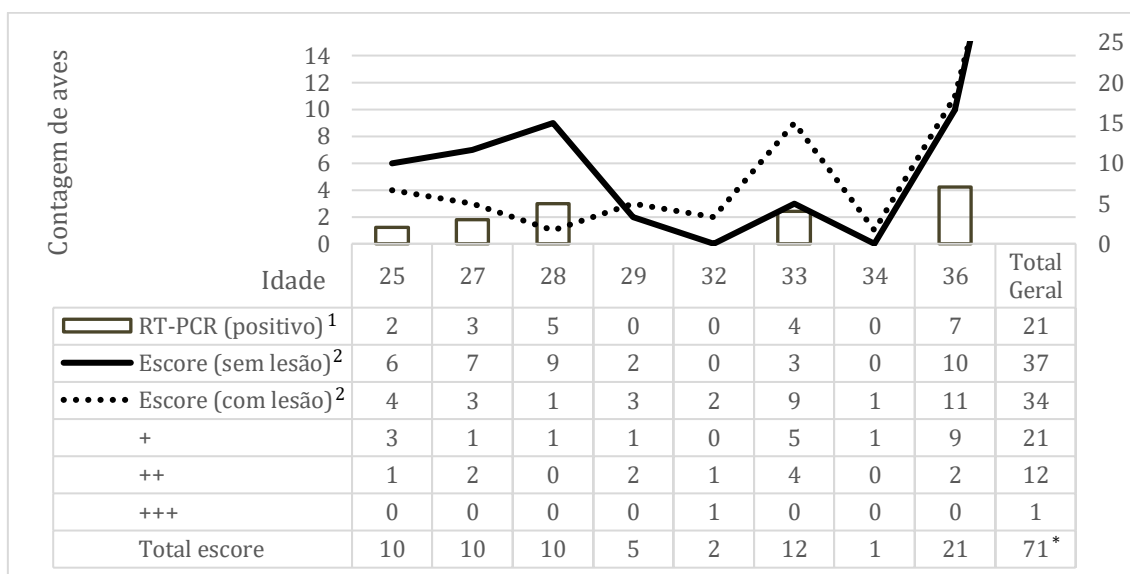
Foi avaliada a existência de associação entre a presença e intensidade de lesões microscópicas com a presença de lesões macroscópicas e diagnóstico por meio de detecção molecular. Além disso, foi realizada a associação de diagnóstico positivo e negativo por RT-PCR e a frequência das lesões histológicas. Para essas análises foram utilizados o teste de qui-quadrado ou exato de Fischer, quando apropriados. As diferenças entre peso vivo e peso padrão *Cobb 500*, espessura do proventrículo e idade das aves em função do escore de lesão histopatológica no proventrículo e diagnóstico por RT-PCR foram investigadas por meio de análise de variância. Para avaliação do peso dos animais, o efeito de lote foi incluído no modelo como uma variável aleatória. Na análise de espessura de proventrículo foi incluída no modelo a idade dos animais como covariável considerando seu efeito linear. Todas as avaliações foram realizadas por meio do *software* SAS 9.4. Foi considerado o nível de significância de 5%.

6. RESULTADOS

6.1. Idade, mortalidade e peso

Os frangos de corte examinados tinham entre 25 e 36 dias e havia lesão histológica de TVP no proventrículo em diferentes intensidades em aves de todas as idades, porém, não nos foi informado a idade de duas aves sendo estas não inclusas nesta avaliação. De acordo com a faixa etária, havia quatro aves (4/10) com lesão aos 25 dias, 3/10 aos 27 dias, 1/10 aos 28 dias, 3/5 aos 29 dias, 2/2 aos 32 dias, 9/12 aos 33 dias, 1/1 aos 34 dias e 11/21 aos 36 dias (Tabela-Gráfico 1). Vinte e um frangos entre 25 a 36 dias foram positivos na RT-PCR. Dentre os 21, 13 continham também lesão histológica de TVP sendo, 2/13 com 25 dias, 2/13 com 27 dias, 1/13 com 28 dias, 3/13 com 33 dias e 5/13 com 36 dias. Oito positivos na RT-PCR não tinham lesão histológica, 1/8 com 27 dias, 4/8 com 28 dias, 1/8 com 33 dias e 2/8 com 36 dias. Não foi observada associação entre a idade e o resultado da RT-PCR. As aves positivas e negativas apresentaram respectivamente, idade média de 31,19 e 30,88 dias de vida. No entanto, houve associação entre lesão histológica e idade. Aves com lesão histológica apresentaram idade média de 32,21 dias e frangos sem lesão 30 dias em média. Quando os diferentes escores foram incluídos, não houve influência da idade média das aves sobre a severidade. Até o final das quatro semanas de idade a mortalidade semanal dos lotes variou entre 0,51% a 4,06% com média de 1,45%. A mortalidade acumulada variou entre 2,18% a 7,38% com média de 5,38%. Não foi possível comparar a mortalidade entre aves com ou sem lesão histológica pois a mortalidade é dada por lote, sendo que as amostras do presente estudo eram de lotes com frangos com e sem lesão de TVP. Quando comparados ao peso padrão do sistema métrico de lote misto do *Cobb 500* (Cobb, 2015) todas as aves apresentaram peso abaixo do padrão da linhagem. As aves do estudo prospectivo tinham no momento da coleta entre 0,504 kg a 1,844 kg e média de 1,063 kg. Vinte e sete de 63 aves sem alteração histológica no proventrículo e negativas na RT-PCR apresentaram média de 0,988 kg. Treze de 63 aves com lesão histológica leve, moderada e acentuada e positiva na RT-PCR tiveram média de 1,087 kg (Tabela-Gráfico 2). No entanto, não foi observada influência do resultado da RT-PCR. Também, foi analisada a presença/ausência de lesão histológica sobre a diferença média entre peso vivo e peso padrão *Cobb*. A diferença média de aves com lesão histológica foi de 1,038 kg e sem lesão 1,064 kg. Frangos positivos na RT-PCR apresentaram diferenças médias para o peso padrão de 1,035 kg e aves negativas de 1,062 kg.

Tabela-Gráfico 1: Associação entre escore do proventrículo, idade e RT-PCR

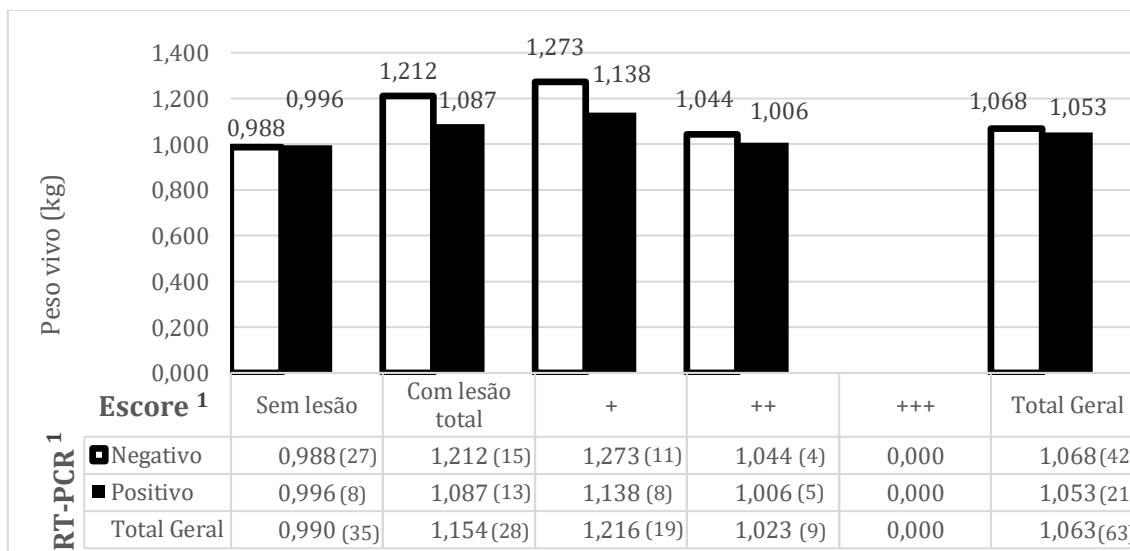


1. Associação não significativa entre resultado por RT-PCR e idade das aves avaliada por meio do teste F ($P>0,05$).

2. Associação significativa entre presença/ausência de lesões histopatológicas e idade das aves avaliada por meio do teste F ($P>0,05$).

* Dois animais de idade desconhecida não foram incluídos na tabela.

Tabela-Gráfico 2: Associação entre escore do proventrículo, RT-PCR e diferença média entre peso vivo e o padrão Cobb* (kg)



1. Associação não significativa entre lesões histológicas, RT-PCR e diferença média entre peso vivo e padrão Cobb* (kg) avaliada por meio do teste F ($P>0,05$).

Entre parênteses está o número de aves utilizadas no cálculo de cada média.

*Diferença, de acordo com a idade, entre peso médio de cada frango de corte recebido no estudo prospectivo e peso padrão do sistema métrico de lote misto do Cobb 500.

6.2. Macroscopia

No exame macroscópico das aves as seguintes lesões foram identificadas: despigmentação de pés, pernas e tegumentos (52/73), pododermatite necrosante (36/73), penas eriçadas (12/73), fezes pastosas alaranjadas (7/73), empenamento ruim (6/73), aumento de volume periorbital (3/73), aerossaculite (3/73), atrofia pancreática (2/73), inchaço da articulação tibiotarso-metatarso (1/73), dilatação ventricular (1/73), pericardite fibrinosa (1/73), fezes enegrecidas (1/73) e petéquias multifocais nos dígitos (1/73). No exame dos proventrículos, havia aumento da espessura da parede (Figura 1) em 8 de 73 (11,0%) aves. Achatamento da mucosa foi constatado em três aves (3/8 -37,5%), além de dilatação das glândulas da submucosa (2/8 – 25,0%), áreas brancas circulares na submucosa (1/8 - 12,5%) e dilatação do istmo (1/8 - 12,5%) (Tabela 2). Quando comparadas as espessuras da submucosa dos proventrículo no exame macroscópico houve influência da presença/ausência de lesões histológicas na espessura do órgão. Frangos com lesão histológica de TVP apresentaram espessura média de 0,578 cm e aves sem lesão microscópica espessura de 0,505 cm.

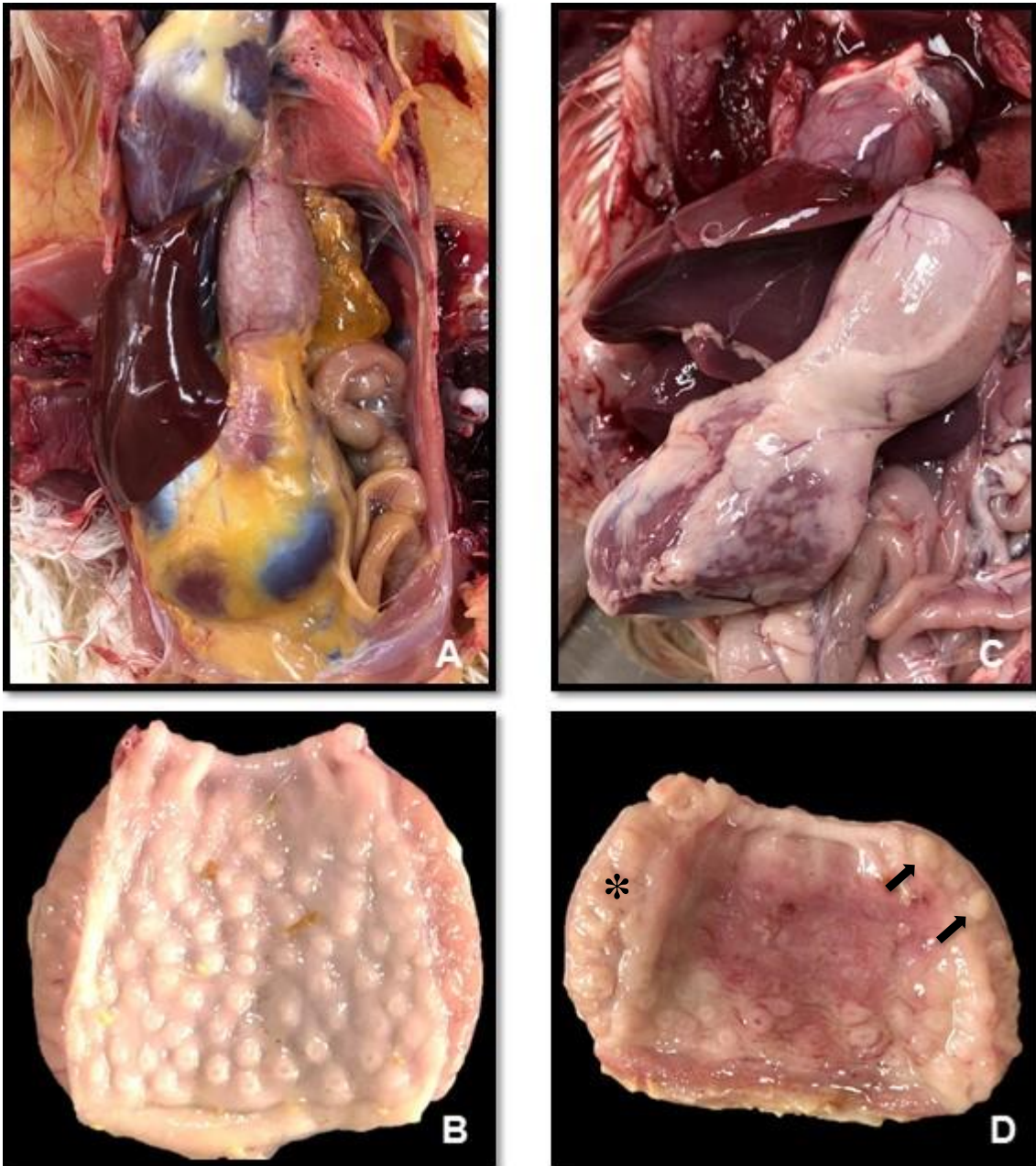


Figura 1. Macroscopia do proventrículo. Frango de corte de 33 dias com proventrículo de aspecto normal (A e B). Frango de corte de 33 dias com redução da proporção do proventrículo para o ventrículo pelo aumento do proventrículo (C). Proventrículo da figura C seccionado longitudinalmente. Há aumento difuso moderado da espessura da parede da submucosa (asterisco) e áreas brancas multifocais a coalescentes (seta) (D).

Tabela 2: Ocorrência de lesões anatomopatológicas considerando o total de aves de lotes com suspeita de TVP e aves com lesão histológica no proventrículo e positivas na RT-PCR

Macroscopia	Total	Lesão proventrículo	Positiva na RT-PCR	
Despigmentação de pés, pernas e tegumentos	52/73 (71,2%)	22/35 (62,9%)	12/24 (50,0%)	
Pododermatite necrosante	36/73 (49,3%)	12/35 (34,3%)	10/24 (41,7%)	
Penas eriçadas	12/73 (16,4%)	3/35 (8,6%)	3/24 (12,5%)	
Fezes pastosas alaranjadas	7/73 (9,6%)	2/35 (5,7%)	3/24 (12,5%)	
Empenamento ruim	6/73 (8,2%)	2/35 (5,7%)	0/24 (0,0%)	
Aumento de volume periorbital	3/73 (4,1%)	2/35 (5,7%)	1/24 (4,2%)	
Aerossaculite	3/73 (4,1%)	2/35 (5,7%)	0/24 (0,0%)	
Desidratação	2/73 (2,7%)	2/35 (5,7%)	2/24 (8,3%)	
Atrofia pancreática	2/73 (2,7%)	1/35 (2,9%)	0/24 (0,0%)	
Inchaço articulação tibiotarso-metatarso	1/73 (1,4%)	1/35 (2,9%)	0/24 (0,0%)	
Dilatação ventrículo	1/73 (1,4%)	0/35 (0,0%)	0/24 (0,0%)	
Pericardite	1/73 (1,4%)	1/35 (2,9%)	0/24 (0,0%)	
Fezes enegrecidas	1/73 (1,4%)	0/35 (0,0%)	0/24 (0,0%)	
Áreas avermelhadas milimétricas nas pernas	1/73 (1,4%)	1/35 (2,9%)	1/24 (8,3%)	
Aumento da espessura da parede do proventrículo	8/73 (11,0%)	5/35 (14,3%)	3/24 (12,5%)	
Proventrículo	Dilatação das glândulas	2/8 (25,0%)	1/35 (2,9%)	1/24 (8,3%)
	Achatamento da mucosa	3/8 (37,5%)	2/35 (5,7%)	0/24 (0,0%)
	Áreas brancas circulares na submucosa	1/8 (12,5%)	1/35 (2,9%)	1/24 (8,3%)
	Dilatação istmo	1/8 (12,5%)	1/35 (2,9%)	1/24 (8,3%)

6.3. Microscopia

Microscopicamente, 35 de 73 (47,9%) proventrículos apresentaram lesões microscópicas características de TVP (Figura 2). Em vinte e nove aves (29/73 - 39,7%) os proventrículos estavam normais. Dentre as 35 positivas, em 21 aves (21/35 - 60,0%) as lesões eram discretas, em 13 (13/35 - 37,1%) moderadas e em uma (1/35 - 2,9%) acentuada (Tabela 3). Não houve associação entre presença/ausência de lesão histológica e macroscopia dos proventrículos. No entanto, houve influência das lesões microscópicas sobre o resultado da RT-PCR, sem a distinção da severidade da lesão histológica. Em 13 (13/21 - 61,9%) dos frangos positivos por RT-PCR foram identificadas lesões no proventrículo e em 27 (27/42 - 64,3%) das aves negativas não havia lesão.

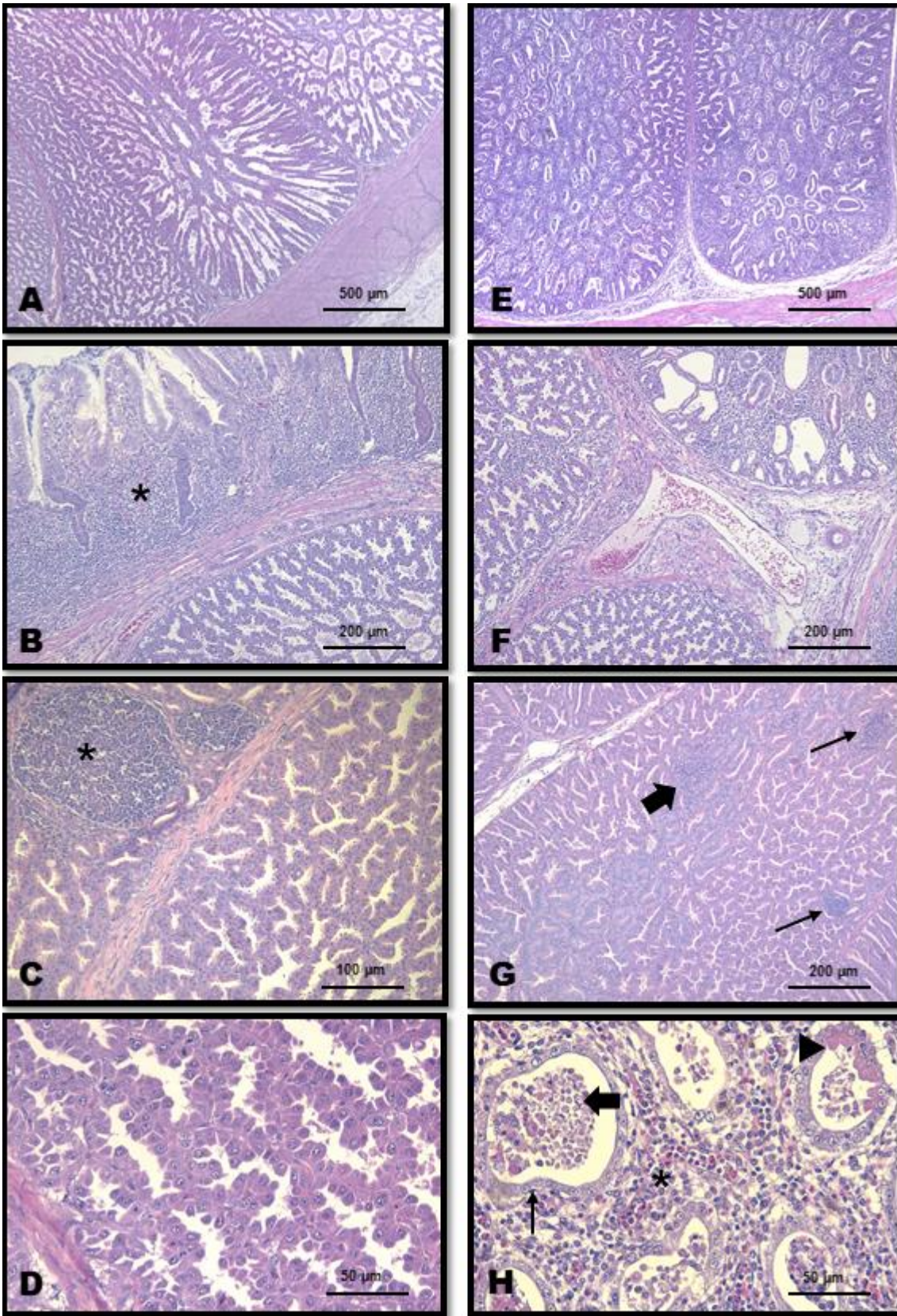


Figura 2. Histopatologia do proventrículo. Proventrículo normal de frango de corte caracterizado por camada serosa com duas camadas musculares, uma interna circular espessa e outra delgada longitudinal externa. Submucosa, com lóbulos glandulares cônicos ou arredondados separados por tecido conjuntivo (A). Proventrículo normal de frango de corte apresentando mucosa com infiltrado inflamatório linfoplasmocitário difuso acentuado (*) considerado normal em aves (B). Proventrículo normal de frango de corte de 36 dias com nódulo linfoide (*) caracterizado por área circunscrita bem delimitada com acúmulo de linfócitos e plasmócitos (C). Proventrículo normal de frango de corte com células glandulares justapostas cúbicas, baixas e de aparência dentada (D). Proventrículo de frango de corte de 28 dias com proventriculite de escore acentuado (+++) com infiltrado linfo-histioplasmocitário multifocal a coalescente acometendo acima de 50% das glândulas com substituição de epitélio glandular multifocal a coalescente acentuado (E). Proventrículo de frango de corte com proventriculite de escore moderado (++) com infiltrado linfo-histioplasmocitário multifocal a coalescente afetando entre 25% a 50% das glândulas com substituição de epitélio glandular multifocal a coalescente discreto (F). Proventrículo de frango de corte de 33 dias com proventriculite de escore discreto (+) com infiltrado linfo-histioplasmocitário multifocal a coalescente afetando até 25% das glândulas (→) com nódulos linfoides ativados multifocal a coalescente discretos (→) (G). Proventrículo de frango de corte de 28 dias com proventriculite de escore acentuado (+++) com ectasia glandular (→), necrose do epitélio glandular (→), metaplasia de epitélio glandular para epitélio ductal (▶) e infiltrado inflamatório linfo-histioplasmocitário (*) (H). Hematoxilina e eosina.

Tabela 3: Associação entre escore do proventrículo, macroscopia do proventrículo e RT-PCR

Escore proventrículo	Macroscopia proventrículo ¹				RT-PCR ²			RT-PCR e Macroscopia **
	Sem alteração	Com alteração*	Total	Negativos	Positivos	Total		
				Total	Total			
Sem lesão	38/73 (52,1%)	35/73 (47,9%)	3/73 (4,1%)	38	27/63 (42,9%)	8/63 (12,7%)	35	2/63 (3,2%)
Com lesão	35/73 (47,9%)	30/73 (41,1%)	5/73 (6,8%)	35	15/63 (23,8%)	13/63 (20,6%)	28	1/63 (1,6%)
+	21/35 (60,0%)	19/30 (63,3%)	2/5 (40,0%)	21	11/15 (73,3%)	8/13 (61,5%)	19	1/1 (100,0%)
++	13/35 (37,1%)	11/30 (36,7%)	2/5 (40,0%)	13	4/15 (26,7%)	5/13 (38,5%)	9	0/1 (0,0%)
+++	1/35 (2,9%)	0/30 (0,0%)	1/5 (20,0%)	1	0/15 (0,0%)	0/13 (0,0%)	0	0/1 (0,0%)
Total	73 (100%)	65/73 (89,0%)	8/73 (11,0%)	73	43/67 (64,2%)***	24/67 (35,8%)***	67***	3/63 (4,8%)

1. Associação não significativa entre lesões histológicas e presença/ausência de alteração macroscópica do proventrículo avaliada por meio do teste de qui-quadrado ou exato de Fischer (P>0,05).

2. Associação significativa entre presença/ausência de lesões histológicas e resultados por RT-PCR avaliada por meio do teste de qui-quadrado ou exato de Fischer (P>0,05).

*Aumento da espessura da parede do proventrículo.

**Aves positivas na RT-PCR e com alteração macroscópica no proventrículo dentre as 63 amostras do estudo prospectivo

***Foi possível realizar a RT-PCR de quatro amostras do estudo retrospectivo (4/10) sendo que três foram positivas, totalizando 67 resultados de RT-PCR. No entanto, não foi possível associar o resultado ao escore do proventrículo por perda da identificação dos proventrículos.

Quando avaliadas separadamente, as lesões mais frequentes em todos os proventrículos foram de infiltrado intersticial linfo-histioplasmocitário acometendo até 25% das glândulas (21/73 – 28,8%), nódulos linfoides ativados em moderada ou acentuada quantidade (24/73 –

32,9%), necrose do epitélio glandular (22/73 – 30,1%) e ectasia glandular (24/73 – 32,9%) (Tabela 4). Não houve influência do resultado da RT-PCR sobre a frequência das lesões histológicas no proventrículo. Após exame histopatológico dos outros órgãos, as principais lesões observadas foram de depleção linfóide da bolsa cloacal (3/73 - 3,1%), lesões na mucosa respiratória sugestivas de micoplasmose (17/73 – 23,3%) ou a associação das duas (40/73 – 54,8%). A alteração visualizada na bolsa cloacal era sugestiva de reação vacinal considerando as características da lesão e a vacinação das aves contra IBDV no incubatório (Tabela 5). No timo e no baço não foram encontradas lesões histológicas.

Tabela 4: Histopatologia e ocorrência das lesões na submucosa dos proventrículos

Lesões microscópicas do proventrículo¹	Frequência
Infiltrado intersticial linfo-histioplasmocitário acometendo acima de 50% das glândulas	1/73 (1,4%)
Metaplasia ductal	11/73 (15,1%)
Discreta quantidade de nódulos linfóides ativados	12/73 (16,4%)
Infiltrado intersticial linfo-histioplasmocitário acometendo de 25% a 50% das glândulas	12/73 (16,4%)
Infiltrado intersticial linfo-histioplasmocitário acometendo até 25% das glândulas	21/73 (28,8%)
Necrose do epitélio glandular	22/73 (30,1%)
Ectasia glandular	24/73 (32,9%)
Moderada ou acentuada quantidade de nódulos linfóides ativados	24/73 (32,9%)

1. Associação não significativa entre frequência das lesões histológicas e resultados por RT-PCR avaliada por meio do teste de qui-quadrado ou exato de Fischer (P>0,05).

Tabela 5: Associação entre diagnósticos histopatológicos sugestivos de lesões concomitantes em todas as aves examinadas e escore dos proventrículos.

Diagnóstico sugestivo	Escore do proventrículo*		Total Geral
	Sem lesão	Com lesão total**	
Enterite parasitária por <i>Eimeria</i> spp., pericardite bacteriana, sugestivo de infecção por <i>Mycoplasma</i> spp. e depleção linfoide da bolsa cloacal	0/38 (0,0%)	1/35 (2,9%)	1/73 (1,4%)
Hepatite bacteriana, infecção sugestiva por <i>Mycoplasma</i> spp. e depleção linfoide da bolsa cloacal	1/38 (2,6%)	1/35 (2,9%)	1/73 (1,4%)
Hepatite e pericardite bacteriana, sugestivo de infecção por <i>Mycoplasma</i> spp. e depleção linfoide da bolsa cloacal	0/38 (0,0%)	1/35 (2,9%)	1/73 (1,4%)
Nefrite intersticial e sugestivo de infecção por <i>Mycoplasma</i> spp e depleção linfoide da bolsa cloacal	0/38 (0,0%)	0/35 (0,0%)	1/73 (1,4%)
Pericardite, traqueite, laringite e depleção linfoide da bolsa cloacal	1/38 (2,6%)	0/35 (0,0%)	1/73 (1,4%)
Enterite parasitária por <i>Eimeria</i> spp. e sugestivo de infecção por <i>Mycoplasma</i> spp	0/38 (0,0%)	2/35 (5,7%)	2/73 (2,7%)
Enterite parasitária por <i>Eimeria</i> spp., sugestivo de infecção por <i>Mycoplasma</i> spp e depleção linfoide da bolsa cloacal	2/38 (5,3%)	0/35 (0,0%)	2/73 (2,7%)
Hepatite bacteriana e sugestivo de infecção por <i>Mycoplasma</i> spp	0/38 (0,0%)	2/35 (5,7%)	2/73 (2,7%)
Depleção linfoide da bolsa cloacal	2/38 (5,3%)	1/35 (2,9%)	3/73 (4,1%)
Sugestivo de infecção por <i>Mycoplasma</i> spp	8/38 (21,1%)	9/35 (25,7%)	17/73 (23,3%)
Sugestivo de infecção por <i>Mycoplasma</i> spp e depleção linfoide da bolsa cloacal	24/38 (63,2%)	16/35 (45,7%)	40/73 (54,8%)
Sem diagnóstico	0/38 (0,0%)	2/35 (5,7%)	2/73 (2,7%)
Total Geral	38	35	73

* Diagnóstico histopatológico referente as principais lesões apresentadas por cada um dos 73 frangos de corte
**Com lesão total representa a soma das alterações histológicas de proventrículo discretas (+), moderadas (++) e acentuadas (+++)

6.4. Detecção molecular e sequenciamento

Sessenta e três proventrículos do estudo prospectivo foram submetidos ao RT-PCR. Quatro proventrículos do estudo retrospectivo foram também analisados. Do total de 67 proventrículos, 24 (35,8%) foram positivos. No entanto, não foi possível associar os dados do RT-PCR do estudo retrospectivo em quatro aves pois os proventrículos foram amostrados na forma de *pool*. Dos quatro, três foram positivos na detecção molecular. Portanto, os dados histopatológicos foram comparados a um total de 63 amostras que corresponde as amostras do estudo prospectivo. Dentre as 63 amostras, foram positivos na RT-PCR, oito (12,7%) proventrículos sem lesão histológica e 13 com lesão histológica (20,6%). Dentre três proventrículos com aumento da espessura e positivos na RT-PCR, dois (2/63 – 3,2%) não

possuíam lesão microscópica e um (1/63 – 1,6%) possuía lesão discreta (Tabela 3). O proventrículo de uma das aves de 35 dias submetido ao RT-PCR foi selecionado para sequenciamento. O produto da amplificação apresentou banda forte no gel de agarose, a qual foi extraída e submetida ao sequenciamento genético. Obteve-se uma sequência de 97 pb referente a uma região do gene VP1 do CPNV. O alinhamento desta sequência com as sequências depositadas no *GenBank* revelou similaridade genética com um fragmento do gene VP1 do CPNV de outros países: 92,68% com amostras dos EUA (Guy et al., 2011b) (HM038436.1), 91,03% com amostras do Reino Unido (Grau-Roma et al., 2016) (KU933603.1) e 87,01% a 90,91% de semelhança com amostras da Espanha de artigo não publicado (MF288606.1 e MF288611.1) (Figura 3).

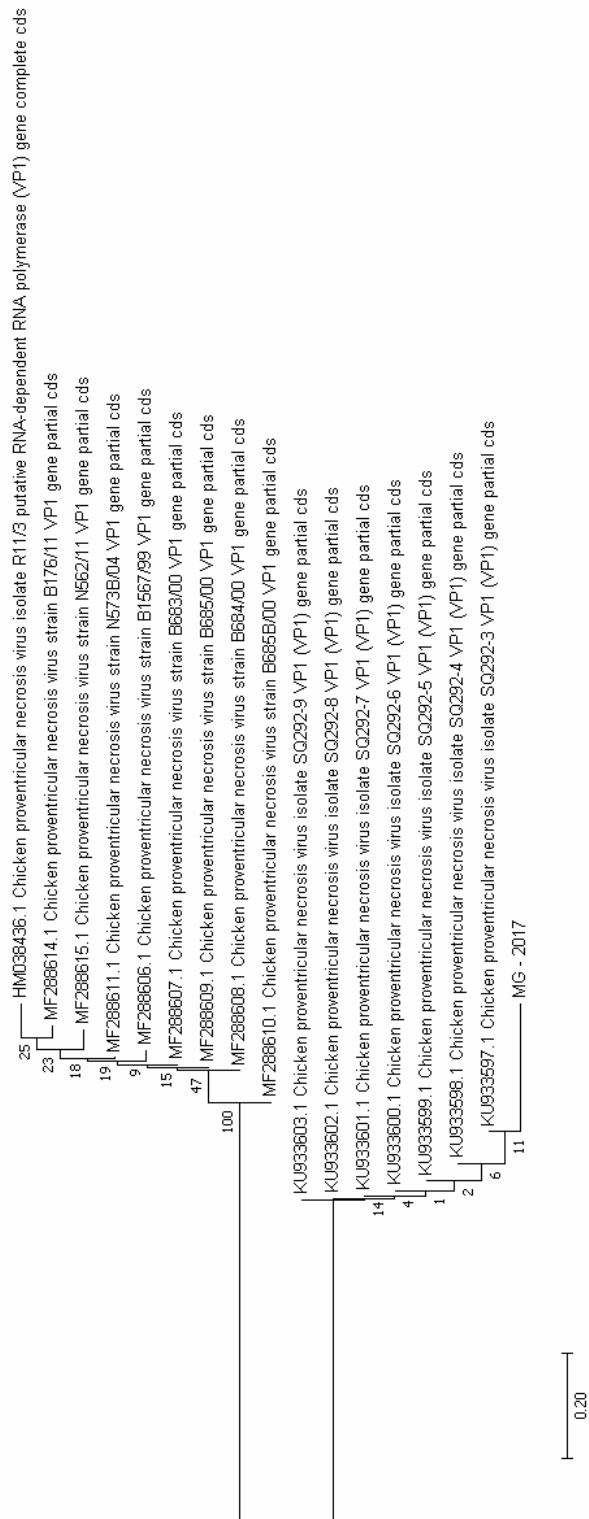


Figura 3. Árvore filogenética com seqüências alinhadas pelo método NJ do gene VP1 do CPNV. Seqüência identificada no estudo (CPNV MG - 2017) e seqüências homólogas do VP1 de isolados de outros três países: EUA (iniciais "HM"), Espanha (iniciais "MF") e Reino Unido (iniciais "KU").

7. DISCUSSÃO

A TVP foi confirmada pela associação das lesões histológicas e macroscópicas do proventrículo juntamente com RT-PCR para o gene VP1 do CPNV. Este resultado está de acordo com o encontrado em outros trabalhos (Guy et al., 2011b; Marusak et al., 2012; Grau-Roma et al., 2016; Allawe et al. 2017). Casos consistentes de TVP com lesão macroscópica de aumento da espessura da parede do proventrículo e microscópica de proventriculite necrótica linfoplasmocitária foram descritos em outros países (Bayyari et al., 1996; Guy et al., 2007; Śmiałek et al, 2017), porém, este é o primeiro relato da doença no Brasil.

A maior parte dos relatos de TVP são em frangos de corte (Bayyari, 1995; Marguerie, et al., 2011; Grau-Roma et al., 2016), embora casos da doença também tenham sido relatados em poedeiras e matrizes pesadas (Marusak et al., 2012; Kim et al., 2015). No entanto, não é possível associar o maior número de relatos em frangos de corte com maior susceptibilidade pois, é necessário um estudo comparativo para demonstrar alguma diferença significativa. Os casos do presente estudo ocorreram em granjas com galpões convencionais que possuíam nível limitado de biossegurança. A forma de transmissão do agente não está esclarecida, somente que há infecção via oral e/ou ocular (Huff et al., 2001; Pantin-Jackwood et al., 2005; Guy et al., 2011b). Portanto, nas granjas de origem desses casos, é possível que as condições de biossegurança tenham favorecido a entrada do vírus via pessoas, fômites, veículos, ração ou outros animais. A idade avançada de apresentação de lesões macroscópicas e histológicas refuta em parte uma hipótese de transmissão vertical. Entretanto, a inoculação do vírus aos 15 dias de incubação via amniótica levou ao aumento do proventrículo em pintos de dois dias (Guy et al., 2005). Não há estudo avaliando a morbidade da doença, e o baixo número de aves analisadas neste estudo não é representativo o suficiente para esta avaliação. Não é possível presumir que a TVP tenha baixa morbidade pela limitada quantidade de relatos da doença, pois esta pode ser subdiagnosticada. O proventrículo é um órgão coletado menos frequentemente para diagnóstico histológico. Além disso, de acordo com o trabalho, apenas cinco dos 35 proventrículos com lesão histológica apresentaram alteração macroscópica (14,29 %), o que reforça a hipótese de doença subdiagnosticada.

No presente estudo, a maior porcentagem de aves com lesões microscópicas ocorreu na faixa entre 29 a 36 dias. Lesões mais acentuadas de TVP foram identificadas em frangos de corte com 33 dias. Estes dados diferem das informações documentadas previamente em frangos de corte, os

quais os frangos tinham entre 18 a 31 dias de idade (Bayyari et al., 1996; Grau-Roma et al., 2010; Guy et al., 2011b, Noiva et al., 2015; Allawe et al., 2017; Śmiałek et al., 2017). No entanto, as aves foram amostradas e examinadas antes de 31 dias (Grau-Roma et al., 2010; Noiva et al., 2015; Allawe et al., 2017; Śmiałek et al., 2017), cuja coleta e exame possivelmente coincidiram com o início e pico dos surtos. No presente estudo, verificou-se que a doença pode se manifestar mais tardiamente pois em algumas dessas aves as lesões ainda eram iniciais. Tanto em trabalhos experimentais como em casos naturais, o vírus já foi identificado por RT-PCR em frangos de corte entre 14 a 31 dias (Guy et al., 2011b; Allawe et al., 2017). Também, foi encontrada positividade em aves entre 25 a 36 dias de idade. Em todos os casos naturais documentados, os proventrículos foram examinados somente até os 31 dias (Allawe et al., 2017). No entanto, um estudo experimental com inoculação aos 14 dias, buscou identificar o vírus até os 49 dias de vida e teve sucesso apenas até os 28 dias (Guy et al., 2011b).

No presente estudo, a taxa de mortalidade dos lotes foi considerada alta, porém, não foi dado acesso ao histórico detalhado dos lotes para efeito de comparação. Vários estudos relatam aumento da mortalidade em lotes com TVP. No entanto, os relatos não são claros quanto a idade em que ela ocorre e a mortalidade total acumulada (Marguerie, et al., 2011; Grau-Roma et al., 2010; Noiva et al., 2015; Grau-Roma et al., 2016). Não há comprovação que a TVP leve a morte da ave nem a deterioração da sua condição, porém há relatos do aumento no descarte de aves refugos em lotes acometidos (Noiva et al., 2015). Neste estudo, outras alterações foram consideradas como mais determinantes no quadro apresentado por cada um dos frangos. Assim como a mortalidade, pouco se sabe sobre o efeito da TVP no desempenho. O peso das aves foi comparado ao peso padrão do sistema métrico de lote misto do *Cobb 500* (Cobb, 2015). Aves sem lesões microscópicas no proventrículo e negativas por RT-PCR possuíam 0,988 kg abaixo do peso padrão e aves com lesões de TVP e positivas por RT-PCR possuíam 1,087 kg abaixo do peso padrão. Os frangos enviados para exame eram refugos ou possuíam peso levemente abaixo do padrão, porém, aves sem lesões microscópicas no proventrículo e negativas na RT-PCR apresentaram menor perda média de peso. No entanto, a correção da influência dos lotes sobre essa diferença demonstrou que não houve associação das lesões e presença do vírus sobre a diferença média para o peso padrão. O proventrículo é responsável pela digestão química no estômago da ave (Zhang et al., 2016), portanto, é esperado que a lesão causada no órgão leve a piora da produtividade e saúde das aves. Por se tratar de um estudo natural, diversas variáveis podem influenciar o resultado como manejo, nutrição, ambiência, qualidade dos pintos alojados e associação de outras doenças, portanto, não foi possível avaliar a interferência da doença na

produtividade e mortalidade das aves. Relatos indicam piora na conversão alimentar, ganho de peso e uniformidade quando associada experimentalmente a outras causas (Bayyari et al., 1995; Bayyari et al., 1996; Huff et al., 2001; Pantin-Jackwood et al., 2004a) ou em casos naturais (Grau-Roma et al., 2010; Noiva et al., 2015; Śmiałek et al., 2017). No entanto, a reprodução da doença em aves SPF não tem levado a queda de índices zootécnicos (Guy et al., 2005; Guy et al., 2007). Outro problema frequentemente descrito nos trabalhos de TVP é o rompimento do istmo gástrico e consequente contaminação da carcaça (Bayyari et al., 1995; Pantin-Jackwood et al., 2005; Noiva et al., 2015). No entanto, não há comprovação desse rompimento em condições naturais até o presente momento. Foi constatado nesse estudo que aves com lesão histológica de TVP apresentam espessura maior da submucosa do proventrículo. Isso se deve provavelmente a intensidade do infiltrado inflamatório. Outros trabalhos não avaliaram essa característica.

As principais lesões histológicas identificadas na submucosa dos proventrículos foram de infiltrado linfo-histioplasmocitário intersticial, nódulos linfoides ativados, necrose do epitélio glandular e ectasia glandular. Neste trabalho, apenas 12 de 73 (16,4%) proventrículos apresentaram metaplasia ductal. Esta é uma alteração difícil de ser determinada na histopatologia pois, em alguns casos, cortes oblíquos das glândulas interferem na visualização exata do local de transição entre o epitélio glandular e o epitélio ductal. Foi considerada como metaplasia ductal a presença significativa de epitélio de ducto na base das glândulas em associação com necrose e inflamação. É possível que outros relatos tenham evidenciado essa alteração com mais frequência ou que o critério utilizado tenha sido diferente. Outras alterações como presença de nódulos linfoides ativados (Guy et al., 2007) e ectasia glandular (Pantin-Jackwood et al., 2004a; Guy et al., 2007; Coman et al., 2011) já foram documentadas.

Dentre as 21 amostras do estudo prospectivo positivas por RT-PCR, em 61,9% (13/21) havia lesões compatíveis com TVP e em 38,1% (8/21) não foram constatadas lesões histológicas. A detecção do RNA viral em proventrículos sem lesões de TVP podem indicar que o vírus estava presente no tecido das aves, possivelmente em latência ou persistência.

Autores indicaram que o CPNV tem período de incubação de dois a três dias (Guy et al., 2011b; Guy et al., 2011b), período considerado curto. Além disso, a sensibilidade e especificidade do RT-PCR atestada é de respectivamente de 88,0% e 83,0% em proventrículo congelado (Guy et al., 2011b). Do total de 28 amostras com lesão histológica do estudo prospectivo, 53,6% (15/28) foram negativas por RT-PCR. Porém, dentre as 15 amostras negativas, 80,0% (12/15) eram de frangos acima de 33 dias e 20,0% (3/15) entre 25 a 27 dias. Um estudo experimental em frangos de corte com TVP encontrou lesão histológica no proventrículo até 49 dias, entretanto,

identificou o CPNV por RT-PCR apenas até os 28 dias de vida das aves. Estes dados indicam que em algumas aves a lesão microscópica pode permanecer mais tempo que a detecção viral.

A principal alteração determinante para classificação do escore das lesões histológicas do proventrículo foi o percentual de acometimento das glândulas da submucosa por infiltrado inflamatório. Esta classificação difere entre autores (Bayyari et al., 1995; Patin-Jackwood et al., 2004b; Patin-Jackwood et al., 2005), no entanto, o escore determinado neste estudo foi semelhante ao apresentado em outros estudos (Guy et al., 2007; Grau-Roma et al., 2016). Dentre os estudos há diferenças quanto a presença de necrose, sendo relatada apenas em casos com infiltrado inflamatório moderado a acentuado (Grau-Roma et al., 2016). No presente trabalho, necrose de células glandulares foi observada em proventrículos de todos os escores.

No exame macroscópico, oito dos 73 frangos tiveram aumento da espessura da parede do proventrículo. Desse total, cinco também possuíam alteração microscópica representando apenas 14,3% do total de 35 aves com lesão histológica. Além disso, três das oito aves foram positivas por RT-PCR. Dentre as três, duas não possuíam lesão histológica e em uma a lesão era discreta. Este resultado mostra que mesmo sem apresentação clínica da doença é possível que as aves estejam infectadas com o vírus e que ele esteja causando danos ao proventrículo. Não foi possível comparar esse resultado com a literatura pois outros trabalhos não fizeram essa associação. Outras alterações macroscópicas descritas anteriormente no proventrículo foram também observadas nas aves do presente trabalho como dilatação das glândulas da submucosa (Guy et al., 2005; Guy et al., 2007), achatamento da mucosa (Bayyari et al., 1996; Pantin-Jackwood et al., 2004b), áreas brancas circulares na submucosa (Goodwin et al., 1996; Pantin-Jackwood et al., 2005) e dilatação do istmo (Bayyari et al., 1996; Huff et al., 2001; Pantin-Jackwood et al., 2004b; Pantin-Jackwood et al., 2005; Kutkat et al., 2010; Coman et al., 2011).

O presente estudo reafirma o CPNV como agente associado a doença. No entanto, há ainda incertezas quanto ao agente etiológico causador da TVP. Por mais que diversos trabalhos indiquem o CPNV como o vírus responsável (Guy et al., 2011a; Guy et al., 2011b Marguerie, et al., 2011; Marusak et al., 2012; Noiva et al., 2015; Grau-Roma et al., 2016; Allawe et al., 2017), não foi possível ainda reproduzir experimentalmente as alterações zootécnicas descritas em casos naturais (Guy et al., 2005; Guy et al., 2007). Além disso, alguns trabalhos levantam a suspeita do papel de outros vírus como responsáveis pela doença (Elkady et al. 2009; Kim et al., 2015; Li et al., 2018). Contudo, ou estes autores pesquisaram o vírus somente do conteúdo do proventrículo, sem utilizar a mucosa e sem comprovar o agente *in situ* associado as lesões ou não testaram também para o CPNV. Ainda assim, muitos dados reforçam a teoria do CPNV como o agente

etiológico da TVP. O vírus já foi isolado e inoculado em aves SPF reproduzindo as lesões macroscópicas e histológicas da doença (Guy et al., 2005; Guy et al., 2007; Guy et al., 2011b). O gene VP1 do CPNV foi identificado no proventrículo de aves com TVP de casos experimentais (Guy et al., 2005; Guy et al., 2007; Guy et al., 2011a; Guy et al., 2011b) e também em outros relatos de ocorrência natural (Marusak et al., 2012; Grau-Roma et al., 2016; Allawe et al. 2017) assim como nas aves do presente estudo. Utilizando a microscopia eletrônica, um vírus com características físicas, genômicas e morfológicas de um birnavírus foi identificado em células epiteliais glandulares de proventrículos acometidos (Guy et al., 2005; Grau-Roma 2010; Guy et al., 2011a). Utilizando IHQ e IFA, o CPNV foi imunomarcado no epitélio glandular do proventrículo de aves com TVP (Guy et al. 2005; Guy et al., 2007; Guy et al., 2011b; Noiva et al., 2015).

Em relação ao papel do IBDV na TVP, no presente estudo, em 48,6% das aves (com lesão microscópica de TVP, foi encontrada depleção linfoide na bolsa cloacal; no entanto, nestas aves foi administrada vacina com vírus vivo atenuado contra IBDV, a qual induz a diminuição da população celular. IBDV foi imunomarcado no proventrículo de frangos de corte com TVP naturalmente infectados, utilizando IFA, porém os autores não pesquisaram a presença do CPNV nesses proventrículos (Elkady et al. 2009; Grau-Roma et al., 2010). A identificação do IBDV no proventrículo não prova que o vírus causa a doença pois há linfócitos B e T que são células susceptíveis a infecção por este vírus (Pantin-Jackwood et al., 2004a). Além disso, estudos não conseguiram reproduzir a TVP inoculando o IBDV em aves SPF (Pantin-Jackwood e Brown, 2003; Pantin-jackwood et al., 2004b). Um estudo utilizou um isolado local de vvIBDV para inocular aves SPF. Neste estudo, a descrição e as imagens apresentadas de proventrículos com infiltrado inflamatório na mucosa (Elkady et al. 2009), diferem de outros estudos. O infiltrado linfocitário na mucosa dos proventrículos é considerado normal como parte do tecido linfoide associado a mucosa (Khadim et al., 2011) e outros vírus não foram testados para o diagnóstico diferencial. Apesar das associações do IBDV na TVP, estudos demonstraram aumento da severidade da doença quando há associação das duas doenças pela ação imunossupressora do IBDV (Pantin-jackwood et al., 2004b; Noiva et al., 2015). Outros vírus como o picornavírus (Kim et al., 2015) e o GyV3 (Li et al., 2018) identificados no proventrículo de aves doentes, não foram re-inoculados para estudo experimental e identificação *in situ*. Portanto, não é possível determiná-los como agentes da doença (Kim et al., 2015; Li et al., 2018)

O percentual de similaridades da sequência identificada neste estudo (CPNV MG – 2017) foi alto em relação às sequências do Reino Unido (Grau-Roma et al., 2016), EUA (Guy et al.,

2011b) e Espanha. Isso pode indicar a migração do vírus entre continentes que poderia ocorrer por fômites, pessoas, aves migratórias ou até mesmo aves de linhagens genéticas. A sequência obtida no presente estudo foi correspondente a 91 pb. Contudo, este gene codifica para RdRp que é conhecido por ser um gene conservado em organismos celulares e vírus (Pan et al., 2007). Este resultado indica a participação do birnavirus na TVP e a associação com a histopatologia confirma o diagnóstico de doença viral.

8. CONCLUSÃO

Este é o primeiro relato de TVP em frangos de corte no Brasil e os resultados histopatológicos em associação com a identificação molecular do gene do CPNV reforçam este como agente da doença. No entanto, o efeito da TVP no desempenho de frangos de corte ainda é desconhecido, podendo o vírus causar prejuízo atuando sozinho ou associado a outros agentes como o IBDV.

Os resultados desse estudo indicam que a TVP pode ser uma doença subdiagnosticada pois, a espessura do ventrículo é variável com o tamanho das aves. Existem proventrículos com aparente aumento da espessura da parede e que histologicamente estão normais e o contrário também ocorre. Portanto, torna-se importante a realização da histopatologia do proventrículo no monitoramento sanitário de lotes com queda de produtividade.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLAWE, A.B.; ABBAS, A.A.; TAHA, Z.H.; ODISHO, S.M. Detection of transmissible viral proventriculitis in Iraq. *J Entomol. Zool. Stud.*, v. 5, n. 5, p. 974–978, 2017.
- APPLE, A.; SKEELES, J.; HOUGHTEN, G.E. *et al.* Investigation of a Chronic Feed-Passage Problem on a Broiler Farm in Northwest Arkansas. *Avian Dis.*, v. 35, n. 2, p. 422–425, 1991.
- BARNES, D.M.; KIRBY, Y.K.; OLIVER, K.G. Effects of biogenic amines on growth and the incidence of proventricular lesions in broiler chickens. *Poult. Sci.*, v. 80, n. 7, p. 906–911, 2001.
- BAYYARI, G.R.; HUFF, W.E.; BALOG, J.M. *et al.* Experimental reproduction of proventriculitis using homogenates of proventricular tissues. *Poult. Sci.*, v.74, n.11, p.1799-1809, 1995.
- BAYYARI, G.R.; HUFF, W.E.; BEASLEY, J.N.; BALOG, J.M.; RATH, N.C. The effect of dietary copper sulfate on infectious proventriculitis. *Poult. Sci.* v. 75, p. 1961–1969, 1996.

- BRACEWELL, C.D.; RANDALL, C.J. The Infectious Stunting Syndrome. *World's Poult. Sci. J.*, v. 40, p. 31–37, 1983.
- BRAR, R.S.; KUMAR, R.; LEISHANGTHEM, G.D. *et al.* Ascaridia galli induced ulcerative proventriculitis in a poultry bird. *J. Parasit. Dis.*, v. 40, n. 2, p. 562–564, 2016.
- BRUGH, M.; WILSON, R.L. Effect of dietary histamine on broiler chickens infected with avian reovirus S1133. *Avian Dis.*, v. 30, n. 1, p. 199–203, 1986.
- BOOM, R.; SOL, C.J.A.; SALIMANS, M.M.M. *et al.* Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids. *J. Clin. Microbiol.*, v. 28, n. 3, p. 495–503, 1990.
- COMAN, A.; RUSVAI, M., DEMETER, Z. *et al.* Histopathological Changes of Transmissible Viral Proventriculitis in Broiler Flocks. *Bull. Univ. Agric. Sci. Vet. Med. Cluj. Napoca*, v. 68, n. 2, p. 93–95, 2011.
- COBB. Suplemento de nutrição e desempenho do frango de corte - *Cobb 500^m*. *Cobb Vantress*, 2015.
- DORNER, J.W; COLE, R.J.; LOMAX, L.G. *et al.* Cyclopiazonic acid production by *Aspergillus flavus* and its effects on broiler chickens. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 46, n. 3, p. 698–703, 1983
- ECCO, R.; BROWN, C.; SUSTA, L. *et al.* In vivo transcriptional cytokine responses and association with clinical and pathological outcomes in chickens infected with different Newcastle disease virus isolates using formalin-fixed paraffin-embedded samples. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.15, p.221–229, 2011.
- ELKADY, M.F.; ALI, A.A.; ABDEL-MONEIM, A.S. The role of infectious bursal disease virus (IBDV) in induction of proventriculitis in broiler chickens. In: *The 16th World Vet. Poult. Assoc. Congr.*, Marrakexe, Marrocos. 2009.
- FELSENSTEIN J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, v.39, p.783-791, 1985,
- GOODWIN, M.A. Esophageal and proventricular cryptosporidiosis in a chicken. *Avian Dis.*, v. 39, n. 3, p. 643–645, 1995.
- GOODWIN, M.A.; HAFNER, S.; BOUNOUS, D.I. *et al.* Viral proventriculitis in chickens. *Avian Pathol.*, v.25, n.2, p.369-379, 1996.

- GOODWIN, M.A. E HAFNER, S. Transmissible viral proventriculitis. In: Calnek, B.W.; Barnes, H.J.; Beard, C.W.; McDougald, L.R.; Saif, Y.M. *Diseases of Poultry* 10th ed. Iowa: Wiley-Blackwell Publishing, 1997. p.1034-1038.
- GRAU-ROMA, L.; MARCO, A.; MARTÍNEZ, J. *et al.* Infectious bursal disease-like virus in cases of transmissible viral proventriculitis. *Vet. Rec.*, v.167, p.836, 2010.
- GRAU-ROMA, L.; REID, K.; BROT, S. *et al.* Detection of transmissible viral proventriculitis (TVP) and Chicken proventricular necrosis virus (CPNV) in the United Kingdom. *Avian Pathol.*, v.46, p.68-75, 2016.
- GUY, J.S.; BARNES, H.J.; SMITH, L. *et al.* Partial characterization of an adenovirus-like virus isolated from broiler chickens with transmissible viral proventriculitis. *Avian Dis.*, v.49, n.3, p.344-351, 2005.
- GUY, J.S.; SMITH, L.G.; EVANS, M.E.; BARNES, H.J. Experimental reproduction of transmissible viral proventriculitis by infection of chickens with a novel adenovirus-like virus (isolate R11/3). *Avian Dis.*, v.51, n.1, p.58-65, 2007.
- GUY, J.S.; WEST, M.A.; FULLER, F.J. Physical and Genomic Characteristics Identify Chicken Proventricular Necrosis Virus (R11/3 Virus) as a Novel Birnavirus. *Avian Dis.*, v.55, n.1, p.2-7, 2011a.
- GUY, J.S.; WEST, M.A.; FULLER, F.J. *et al.* Detection of R11/3 virus in experimental and naturally-occurring cases of transmissible viral proventriculitis using a reverse-transcriptase polymerase chain reaction procedure. *Avian Dis.*, v.55, n.1, p.70-75, 2011b.
- HUFF, G.R.; ZHENG, Q.; NEWBERRY, L.A. *et al.* Viral and bacterial agents associated with experimental transmission of infectious proventriculitis of broiler chickens. *Avian Dis.*, v. 45, n. 4, p. 828–843, 2001.
- JACKSON, C.A.; DUNN, S.E.; SMITH, D.I. *et al.* Proventriculitis, “nakanuke” and heticuloendotheliosis in chickens following vaccination with herpesvirus of turkeys (hvt). *Aust. Vet. J.*, v. 53, p. 457–459, 1977.
- JENSEN, L.S.; DUNN, P.A.; DOBSON, K.N. Induction of oral lesions in broiler chicks by supplementing the diet with copper. *Avian Dis.*, v. 35, n. 4, p. 969–973, 1991.
- KADHIM, K.K.; ZUKI, A.B.Z.; NOORDIN, M.M.; BABJEE, S.M.A. Histomorphology of the Stomach, Proventriculus and Ventriculus of the Red Jungle Fowl. *Anat. Histol. Embryol.*, v. 40, n. 3, p. 226–233, 2011.

- KIM, H.-R.; YOON, S.-J.; LEE, H.-S.; KWON, Y.-K. Identification of a picornavirus from chickens with transmissible viral proventriculitis using metagenomic analysis. *Arch. Virol.*, v.160, n.3, p.701-709, 2015.
- KOUWENHOVEN, B.; DAVELAAR, F.G.; VAN WALSUM, J. Infectious proventriculitis causing runting in broilers. *Avian Pathol.*, v.7, n.1, p.183-187, 1978.
- KOUWENHOVEN, B.; VERTOMMEN, M.H.; GOREN, E. Runting in broilers. In: McFerran, J.B. E McNulty, M.S. *Acute virus infections of poultry*. Brussels: Martinus Nijhoff publishers, 1986. p. 165-178.
- KUBENA, L.F.; DEATON, J.W.; MAY, J.D.; REECE, F.N. A dietary method to correct a gizzard abnormality of broilers. *Poult Sci.*, v. 53, p. 407-409, 1974.
- 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.
- KUTKAT, M.A.; AHMED, H.M.; KHALIL, S.A. *et al.* Studies on proventriculitis in Broilers with molecular characterization to its viral causes. *J. Am. Sci.*, v. 6, n. 9, p. 582-592, 2010.
- LI, G.; YUAN, S.; HE, M. *et al.* Emergence of gyrovirus 3 in commercial broiler chickens with transmissible viral proventriculitis. *Transbound. Emerg. Dis.*, v. 65, n. 5, p. 1-5, 2018.
- LENZ, S.D.; FREDERIC, J.H.; ALFRED, C.E. *et al.* Gastrointestinal pathogenicity of adenoviruses and reoviruses isolated from broiler chickens in Alabama. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v. 10, p. 145-151, 1998.
- LUNA, L.G. Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology. 3. ed. New York: McGraw-Hill, 1968. 258p
- MARGUERIE, J.; LEON, O.; ALBARIC, O. *et al.* Birnavirus-associated proventriculitis in French broiler chickens. *Vet. Rec.*, v.169, p.394-396, 2011.
- MARUSAK, R.A.; WEST, M.A.; DAVIS, J.F. *et al.* Transmissible viral proventriculitis identified in broiler breeder and layer hens. *Avian Dis.*, v.56, n.4, p.757-759, 2012.
- NEWBERNE, P.M.; MUHRER, M.E.; CRAGHEAD, R.; O'DELL, B.L. An abnormality of the proventriculus of the chick. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 128, p. 553-555. 1956.
- NOIVA, R.; GUY, J.S.; HAUCK, R.; SHIVAPRASAD, H.L. Runting Stunting Syndrome Associated with Transmissible Viral Proventriculitis in Broiler Chickens. *Avian Dis.*, v. 59, n. 3, p. 384-387, 2015.

- PAGE, R.K.; FLETCHER, O.J.; ROWLAND, G.N. *et al.* Malabsorption syndrome in broilers chickens. *Avian Dis.*, v.26, n.3, p.618-624, 1982.
- PAN, J; VAKHARIA, V.N.; TAO, Y.J. The structure of a birnavirus polymerase reveals a distinct active site topology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 104, n. 18, p. 7385–7390, 2007.
- PANTIN-JACKWOOD, M.J. e BROWN, T.P. Infectious bursal disease virus and proventriculitis in broiler chickens. *Avian Dis.*, v. 47, n. 3, p. 681–90, 2003.
- PANTIN-JACKWOOD, M.J.; BROWN, T.P.; HUFF, G.R. Proventriculitis in broiler chickens: Immunohistochemical characterization of the lymphocytes infiltrating the proventricular glands. *Vet. Pathol.*, v. 41, n. 6, p. 641–648, 2004a.
- PANTIN-JACKWOOD, M.J.; BROWN, T.P.; KIM, Y.; HUFF, G.R. Proventriculitis in broiler chickens: effects of immunosuppression. *Avian Dis.*, v. 48, n. 2, p. 300–316, 2004b.
- PANTIN-JACKWOOD, M.J.; BROWN, T.P.; HUFF, G.R. Reproduction of proventriculitis in commercial and specific-pathogen-free broiler chickens. *Avian Dis.*, v.49, n.3, p.352-360, 2005.
- PEGRAM, R.A. e WYATT, R.D. Avian gout caused by oosporein, a mycotoxin produced by *Caetomium trilaterale*. *Poult Sci.*, v. 60, n. 11, p. 2429–2440, 1981.
- PHALEN, D.N. e MOORE, R.P. Experimental infection of white-leghorn cockerels with *Macrorhabdos ornithogaster* (Megabacterium). *Avian Dis.*, v. 47, n. 2, p. 254–260, 2003.
- RIDDELL, C. The Influence of Fiber in the Diet on Dilation (Hypertrophy) of the Proventriculus in Chickens. *Avian Dis.*, v. 20, n. 2, p. 442–445, 1976.
- RIJSEWIJK, F.A.M.; SANTOS, H.F.; TEIXEIRA, T. F. *et al.* Discovery of a genome of a distant relative of chicken anemia virus reveals a new member of the genus Gyrovirus. *Arch. Virol.*, v. 156, n. 6, p. 1097–1100, 2011.
- 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.
- SHAPIRO, F e NIR, I. Stunting Syndrome in Broilers: Physical, Physiological, and Behavioral Aspects. *Poult. Sci.*, v. 74, p. 33–44, 1995.
- SHIFRINE, M; ADLER, H.E.; OSTERHOUT, L.L. The pathology of chicks fed histamine. *Avian Dis.*, v. 4, n. 1, p. 12–21, 1960.

ŚMIAŁEK, M; GESEK, M; ŚMIAŁEK, A. Identification of Transmissible Viral Proventriculitis (TVP) in broiler chickens in Poland. *Pol. J. Vet. Sci.*, v. 20, n. 2, p. 417–420, 2017.

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.

TAYLOR, R.D. e JONES, G.P.D. The influence of whole grain inclusion in pelleted broiler diets on proventricular dilatation and ascites mortality. *Br. Poult. Sci.*, v. 45, n. 2, p. 247–254, 2004.

VOGELSTEIN, B., GILLESPIE, D. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *P Natl Acad. Sci. USA.* v.76, p. 615–619, 1979.

WIDEMAN, R.F.; KIRBY, Y.K.; BARTON, T.L.; CLARK, D. Excess dietary copper triggers enlargement of the proventriculus in broilers. *J. Appl. Poult. Res.*, v. 5, n. 3, p. 219–230, 1996.

YU, L; JIANG, Y.; LOW, S. *et al.* Characterization of three infectious bronchitis virus isolates from china associated with proventriculus in vaccinated chickens. *Avian Dis.*, v. 45, n. 2, p. 416–424, 2001.

ZHANG, H., GE, T., PENG, S. *et al.* Microstructure Features of Proventriculus and Ultrastructure of the Gastric Gland Cells in Chinese Taihe Black-bone Silky Fowl (*Gallus gallus domesticus* Brisson). *Anat. Histol. Embryol.*, v. 45, n. 1, p. 1–8, 2016.

10. ANEXOS

10.1. Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG (CEUA)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Etiologia e patologia da proventriculite viral transmissível em frangos de corte infectados naturalmente", protocolo do CEUA: 100/2017 sob a responsabilidade de Roselene Ecco que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 18/09/2017.

Vigência da Autorização	18/09/2017 a 17/09/2022
Finalidade	Pesquisa
*Espécie/linhagem	Ave / híbrido
Nº de animais	43
Peso/Idade	2kg / 3(semanas)
Sexo	masculino
Origem	aviário
*Espécie/linhagem	Ave / híbrido
Nº de animais	43
Peso/Idade	3kg / 4(semanas)
Sexo	masculino
Origem	aviário
*Espécie/linhagem	Ave / híbrido
Nº de animais	43
Peso/Idade	2kg / 3(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	aviario

Considerações posteriores:

18/09/2017	Aprovado na reunião do dia 18/09/2017. Validade: 18/09/2017 à 17/09/2022
------------	--

Belo Horizonte, 23/10/2017.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG
https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha

10.2. Termo de consentimento e sigilo livre esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO E SIGILO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado(a) a participar de um estudo sobre **etiologia e patologia da proventriculite viral transmissível em frangos de corte infectados naturalmente**.

Um texto incluindo revisão de literatura, justificativa, objetivos e metodologia estão anexados a este termo para esclarecimento sobre a pesquisa.

A sua participação é voluntária. Não há interesse financeiro neste estudo.

Esse estudo foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG e aprovado sob o número de protocolo 169/2017.

É um estudo sigiloso e os dados referentes a sanidade do seu plantel serão avaliados somente pelos pesquisadores responsáveis. Os resultados serão divulgados somente em revistas científicas, sem identificação da granja ou do proprietário.

Por favor, esclareça todas as suas dúvidas antes de assinar este termo. Em caso de dúvidas futuras entre em contato com o grupo de pesquisadores.

Solicitamos também que nossa pesquisa não seja divulgada a terceiros pelos responsáveis pela granja até a finalização do estudo.

Dessa maneira:

1. Informo que li o documento acima e o anexo, retirei as dúvidas e compreendi de maneira satisfatória sobre a minha participação neste estudo.

2. Entendo que minha participação é voluntária e posso recusar em participar em qualquer momento, sem prejuízo para a empresa.

3. Compreendo que o material biológico será utilizado apenas para fins científicos bem como autorizo o uso dessas informações para fins de publicação científica.

Assinatura da coordenadora

Data

A equipe de trabalho é coordenada pela professora do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias, setor de Patologia Animal da UFMG, Prof^a. Dr^a. Roselene Ecco.

Assinatura proprietário ou responsável

Data

Assinatura do responsável técnico

Data