

Universidade Federal de Minas Gerais

Dayse Helena Lages da Silva

**DETERMINAÇÃO DA MICROBIOTA DO ÍLEO DE DIFERENTES DOENÇAS
GASTROINTESTINAIS EM FRANGOS DE CORTE: ENTERITE VIRAL E EROSÃO
DE VENTRÍCULO**

Belo Horizonte

2023

Dayse Helena Lages da Silva

**Determinação da microbiota do íleo de diferentes doenças
gastrointestinais em frangos de corte: enterite viral e erosão de
ventrículo**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para Obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal.

Área de concentração: Ciência Animal

Orientador: Prof.(a) Roselene Ecco

Co-orientadores: Prof. Oliveiro Caetano de Freitas Neto

Prof. (a) Daniele da Gloria de Souza

Belo Horizonte
2023

S586d Silva, Dayse Helena Lages da ,1987-
Determinação da microbiota do Íleo de diferentes Doenças gastrointestinais em frangos de corte: enterite viral de ventrículo /Dayse Helena Lages da Silva. – 2023.
59f: il

Orientadora: Roselene Ecco
Tese (Doutorado) apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária da UFMG, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciência animal.

Bibliografias: f. 110 a 113.

1. Frango de corte - Doença - Teses - 2. Íleo - Doenças - Diagnóstico - Teses - 3. Ciência animal - Teses - I. Ecco, Roselene - II. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária - III. Título.

CDD – 636.513

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes CRB 2569
Biblioteca da Escola de Veterinária, UFMG.



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

FOLHA DE APROVAÇÃO

DAYSE HELENA LAGES DA SILVA

Tese submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de DOUTOR em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração Patologia Animal.

Aprovado(a) em 28 de abril de 2023, pela banca constituída pelos membros:

Dr.(a). Roselene Ecco - Orientador(a)

Dr.(a). Renata Assis Casagrande

Dr.(a). Belchiolina Beatriz Fonseca

Dr.(a). Flavia Figueira Aburjaile

Dr.(a). Nelson Rodrigo da Silva Martins



Documento assinado eletronicamente por **Roselene Ecco, Professora do Magistério Superior**, em 28/04/2023, às 17:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Flávia Figueira Aburjaile, Professora do Magistério Superior**, em 02/05/2023, às 12:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Nelson Rodrigo da Silva Martins, Professor do Magistério Superior**, em 02/05/2023, às 13:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Renata Assis Casagrande, Usuário Externo**, em 02/05/2023, às 13:25, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Belchiolina Beatriz Fonseca, Usuária Externa**, em 17/07/2023, às 10:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2243726** e o código CRC **BEF0800C**.

Referência: Processo nº 23072.230307/2020-47

SEI nº 2243726

AGRADECIMENTO

Agradeço à Deus pela oportunidade de ter feito este trabalho, por guiar meu caminho, ter me ajudado a superar todos os obstáculos, me dando forças para continuar mesmo nos momentos mais difíceis.

Aos meus pais pela paciência, carinho, dedicação, apoio em todos os momentos da minha vida. Ao meu irmão Rodrigo por me apoiar e me ajudar nos momentos que preciso.

A minha orientadora, Roselene Ecco, pela confiança, paciência, auxílio, incentivo, apoio e pela oportunidade de desenvolver esse trabalho com aves. Uma professora admirável pelo empenho e uma profissional inspiradora.

Aos meus co-orientadores Oliveira Caetano e Danielle da Glória pelos ensinamentos, contribuições e pelo auxílio durante a execução do trabalho e paciência para a conclusão deste trabalho.

Aos colaboradores que me ajudaram na execução desse projeto: Diego Lisboa agradeço por me orientar em cada etapa do processo laboratorial e na análise de dados do trabalho, Anna Gabriela e toda a equipe do Aquacen pela paciência e disponibilidade para utilização do laboratório.

A todos os pós graduando e ICs do multilab Carlo Eduardo, Marcelo, Maira, Natália, Eric, Luana, Yamin, Pedro pelo apoio, amizade e paciência durante todo o período do doutorado.

Agradecimento especial ao Rodrigo Luiz por estar comigo em todas as etapas da execução do projeto, sem ele seria tudo mais difícil, foi fundamental todo o apoio, amizade, companheirismo e paciência. Agradecimento de todo o coração para o professor Leonardo Lara que desde o começo do doutorado me acolheu e foi além de um professor espetacular, foi meu melhor amigo, um grande mestre e conselheiro.

A minha amiga Victória por me aguentar nos momentos difíceis, obrigada por ser uma pessoa tão especial e um grande presente que a avicultura me deu na vida.

À Escola de Veterinária da UFMG por tantos anos de aprendizado e me proporcionar a realização de um sonho.

“A coisa mais bela que podemos vivenciar é o mistério. Ele é fonte fundamental de toda verdadeira arte e de toda ciência. Aquele que não o conhece e não mais se maravilha, paralisado em êxtase, é como se estivesse morto: seus olhos estão fechados.”

Albert Einstein

RESUMO

A síndrome do definhamento e refugagem (em inglês, *runting stunting syndrome* - RSS) é uma doença viral entérica em aves comerciais que causa impacto direto na saúde intestinal, contudo, a influência sobre a microbiota intestinal ainda é desconhecida. O objetivo deste estudo foi investigar as características da composição da comunidade bacteriana do íleo de frangos de corte naturalmente acometidos e não acometidos pela RSS, usando tecnologia de sequenciamento de nova geração (NGS). Foram utilizadas amostras do conteúdo e da mucosa do íleo de pintinhos de duas propriedades distintas com dois lotes diferentes, dos quais um grupo era da propriedade 01, com pintinhos de 7 dias de idade e outro da propriedade 02, com pintinhos de 6 dias de idade, totalizando 32 amostras. Desses, 18 eram pintinhos com RSS e 14 sem RSS. As propriedades eram de dois municípios distintos do estado de Minas Gerais. Os resultados revelaram alterações na microbiota intestinal dos dois grupos de pintinhos com RSS. Houve uma diminuição na riqueza e na diversidade microbiana no intestino dos pintinhos da propriedade 01 com RSS. Observou-se aumento da população do gênero *Lactobacillus* nos pintinhos da propriedade 02 com RSS. Nos pintinhos da propriedade 01 com RSS, houve aumento do gênero *Candidatus Arthromitus* e diminuição de *Lactobacillus*, além disso, foi detectado aumento do gênero *Clostridium sensu stricto* 1. Os resultados sugerem uma relação entre a infecção viral e a composição microbiana intestinal que pode causar disbiose intestinal e pode influenciar a inflamação desse órgão. Outra parte deste trabalho teve como objetivo uma investigação diagnóstica sobre causa de atraso no crescimento e refugagem em 22 pintinhos de corte com 7 dias de idade, que apresentavam comportamentos de desconforto ambiental. Foi realizada a análise para caracterização da microbiota intestinal ileal desses pintinhos por NGS e reação em cadeia da polimerase (PCR) de ventrículos para o adenovírus aviário (FAdV), com resultado negativo. Os resultados revelaram erosão no ventrículo em várias dessas aves, juntamente com conteúdo intestinal mal digerido. Nos testes de Shannon e Simpson houve um aumento da diversidade das espécies na microbiota dos pintinhos com erosão do ventrículo, contudo, não houve diferença significativa na composição da microbiota ileal entre os grupos. O estresse ambiental e/ou micotoxinas possivelmente podem ter sido causas de erosão do ventrículo desses pintinhos, condição que também pode ser relacionada com má digestibilidade e atraso no ganho de peso e crescimento em pintinhos.

Palavras-Chave: microbiota intestinal, íleo, síndrome do definhamento e refugagem, erosão de ventrículo, sequenciamento.

ABSTRACT

Runting stanting syndrome (RSS) is an enteric disease in broiler chicken that directly impacts gut health; however, the influence on the intestinal microbiota is still unknown. The objective of this work was to investigate the characteristics of the bacterial community composition of the ileum of broiler chickens naturally affected and not affected by RSS, using next-generation sequencing technology (NGS). Samples of the content and mucosa of the ileum of chicks from two different farms with two different flocks were used, of which one group was from farm 01, with 7-day-old chicks and another from farm 02, with 6-day-old chicks, totaling 32 samples. Of these, 18 were chicks with RSS and 14 without RSS. The farms belonged to two different municipalities in the state of Minas Gerais. The results revealed alterations in the intestinal microbiota of the two groups of chicks with RSS. There was a decrease in microbial richness and diversity in the gut of chicks from farm 01 with RSS. There was an increase in the population of the genus *Lactobacillus* in chicks from farm 02 with RSS. In chicks from farm 01 with RSS, there was an increase in the genus *Candidatus Arthromitus* and a decrease in *Lactobacillus*, in addition, an increase in the genus *Clostridium sensu stricto 1* was detected. The results suggest a relationship between viral infection and intestinal microbial composition that can cause dysbiosis intestine and can influence the inflammation of this organ. Another part of this work aimed at a diagnostic investigation into the cause of growth retardation in 22 broiler chicks, 7 days old, that showed behaviors of environmental discomfort. Analysis was performed to characterize the ileal intestinal microbiota of these chicks by NGS and polymerase chain reaction (PCR) of ventricles for avian adenovirus (FAAdV), with negative results. The results revealed erosion in the ventricle in several of these broiler chickens, along with poorly digested intestinal contents. In the Shannon and Simpson tests, there was an increase in species diversity in the microbiota of chicks with ventricle erosion, however, there was no significant difference in the composition of the ileal microbiota between groups. Despite the numerous causes of ventricle erosion that were not investigated in this work, it is suggested that environmental stress was responsible, being a consequence of changes that were already occurring in the gastrointestinal system of these chicks.

Keywords: gut microbiota, ileus, Runting stanting syndrome, ventricle erosion, sequencing.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Principais táxons pesquisados ao longo do sistema gastrointestinal de aves de produção. Adaptado por Yeoman et al. 2012; Feye et al. 2020; Rychick et al., 2020; Zhou et al., 2021; Aruwa et al. 2021..... 25

CAPÍTULO I

Figura 1: Gráficos de diversidade alfa para cada grupo, sendo **(A)** pintinhos da propriedade 02 com 6 dias de idade e **(B)** pintinhos da propriedade 01 com 7 dias de idade. Gráfico de riqueza de espécies observadas (observed) e medidas de diversidade alfa: Chao1, ACE (Estimador de riqueza de espécies), testes de Shannon e Simpson (índices de diversidade das espécies). O boxplot vermelho indica o grupo pintinhos sem RSS e o azul o grupo com RSS. Não foram observadas diferenças significativas usando o teste de Mann Whitney ($P > 0,05$) nos pintinhos da propriedade 02. Nos pintinhos da propriedade 01 houve diferença significativa no índice de Shannon ($p=0,04$). 75

Figura 2: Análise de coordenadas principais UniFrac ponderado. **(A)** Pintinhos da propriedade 01 com 7 dias de idade e **(B)** Pintinhos da propriedade 02 com 6 dias de idade. Cada ponto representa uma amostra (pintinhos). Vermelho representa o grupo pintinhos sem RSS e o azul o grupo dos pintinhos com RSS. As amostras pertencentes ao mesmo grupo e mais próximas umas das outras e a distância maior entre pontos em grupos diferentes representam um modelo de classificação bom. As amostras marcadas em círculos é a formação de um cluster próximo do grupo com RSS. 76

Figura 3: Gráfico de barra empilhado da abundância dos principais filos e famílias presente no íleo de pintinhos da propriedade 01 de 7 dias de idade, grupo A (sem RSS) e grupo B (com RSS), cada coluna representa um pintinho. 77

Figura 4: Gráfico de barra empilhado da abundância das principais famílias e gêneros presente no íleo de pintinhos da propriedade 01 com 7 dias de idade, grupo A (sem RSS) e grupo B (com RSS), cada coluna representa um pintinho. 78

Figura 5: Heatmap demonstrando a abundância dos gêneros no íleo dos pintinhos da propriedade 01 com 7 dias de idade. O grupo A representa os pintinhos sem RSS e o grupo B os pintinhos com RSS, cada coluna representa um pintinho. 79

Figura 6: Plot de OTUs diferencialmente abundantes nos grupos com RSS versus sem RSS de pintinhos da propriedade 01 com 7 dias de idade ($p_{adj} < 0,05$) de acordo com a análise DESeq2. As OTUs significativas são representadas por pontos de dados únicos, agrupados por gênero no eixo x e por cor de acordo com a família taxonômica de origem da OTU. 80

Figura 7: Gráfico de barra empilhado da abundância dos principais filos e famílias presente no íleo de pintinhos da propriedade 02 com 6 dias de idade, grupo A (sem RSS) e grupo B (com RSS), cada coluna representa um pintinho. 81

Figura 8: Gráfico de barra empilhado da abundância das principais famílias e gêneros presente no íleo de pintinhos da propriedade 02 com 6 dias de idade, grupo A (sem RSS) e grupo B (com RSS), cada coluna representa um pintinho. 82

Figura 9: Heatmap demonstrando a abundância dos gêneros no íleo dos pintinhos da propriedade 02 com 6 dias de idade. O grupo A sem RSS e o B com RSS, cada coluna representa um pintinho. 83

Figura 10: Plot de OTUs diferencialmente abundantes nos grupos com RSS versus sem RSS de pintinhos da propriedade 02 com 6 dias de idade ($p_{adj} < 0,05$) de acordo com a análise DESeq2. As OTUs significativas são representadas por pontos de dados únicos, agrupados por gênero no eixo x e por cor de acordo com a família taxonômica de origem da OTU. 84

CAPÍTULO II

Figura 1: Pintinhos agrupados aparentando estar com desconforto ambiental 100

Figura 2: **(A)** Há desuniformidade entre os pintinhos de 7 dias de idade, todos com atraso no crescimento, sendo o do meio mais acentuado em comparação aos outros. **(B)** Excretas úmidas com ração má digerida. 101

Figura 3: Intestino delgado, pintinho de 7 dias de idade. **(A)** O intestino está mais pálido que o normal, distendido por gases e com conteúdo aquoso. **(B)** Íleo. Alimento mal digerido no lúmen. 101

Figura 4: Ventrículo, pintinho de 7 dias de idade. **(A)** Na membrana coilina há áreas multifocais deprimidas redondas a ovaladas de bordas elevadas (erosão) e área de hemorragia discreta. **(B)** Erosão na membrana coilina acentuada com centro marrom. 102

Figura 5: Ventrículo, pintinhos de 7 dias de idade. Degeneração e perda da membrana coilina. Hematoxilina e eosina (HE). Bar = 500 μ m. 102

Figura 6: Ventrículo, pintinhos de 7 dias de idade. Degeneração e perda da membrana coilina com restos celulares. Hematoxilina e eosina (HE). Bar = 100 μ m. 103

Figura 7: Ventrículo, pintinhos de 7 dias de idade. Na camada da mucosa, na lâmina própria, há heterófilos, linfócitos e fibrina com foco de perda epitelial e fibroplasia discreta. Hematoxilina e eosina (HE). Bar = 50 μ m. 103

Figura 8: Gráfico de diversidade alfa, sendo (A) pintinhos sem erosão de ventrículo (B) pintinhos com erosão de ventrículo. Gráfico de riqueza de espécies identificadas (observed) e medidas de diversidade alfa: Chao1, ACE (Estimador de riqueza de espécies), testes de Shannon e Simpson (índices de diversidade das espécies). Somente no teste de Shannon e Simpson houve diferença com maior diversidade do grupo com erosão de ventrículo. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos usando os testes de Mann Whitney ($P > 0,05$)..... 108

Figura 9: Análise de coordenadas principais UniFrac ponderado. (A) pintinhos sem erosão de ventrículo (B) pintinhos com erosão de ventrículo. Cada ponto representa uma amostra. Se as amostras pertencentes ao mesmo grupo estiverem mais próximas umas das outras, e a distância entre pontos em grupos diferentes for maior, o modelo de classificação é bom. Nesse caso, não houve formação de um cluster..... 109

Figura 10: Gráfico de barra empilhado com a abundância dos principais filos e famílias presente no óleo de pintinhos de 7 dias de idade. Grupo A (sem erosão de ventrículo) e grupo B (com erosão de ventrículo). 110

Figura 11: Gráfico de barra empilhado da abundância dos principais gêneros presente no óleo de pintinhos de 7 dias de idade, grupo A (sem erosão de ventrículo) e grupo B (com erosão de ventrículo)..... 111

Figura 12: Heatmap demonstrando a abundância dos gêneros no óleo dos pintinhos de 7 dias de idade. O grupo A sem erosão de ventrículo e o B com erosão de ventrículo. 112

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Vírus identificado por NGS em 08 amostras com RSS da propriedade 01.	65
---	----

LISTA DE ABREVIACÕES

16S rRNA : RNA ribossômico 16S
18S rRNA : RNA ribossômico 18S
ACTH: Hormônio adrenocorticotrófico
AEV: Vírus da encefalite aviária
AIV: Vírus da influenza aviária
ANV: Vírus da nefrite aviária
APEC: *E. coli* patogênica aviária
ARV: Reovírus
AvRV: Rotavírus aviário
bla_{NDM}: Betalactamase
CAstV: Astrovírus das galinhas
ChPV: Parvovírus das galinhas
DNA: Ácido desoxirribonucleico
DON: Desoxinivalenol
ELISA: Ensaio imunoenzimático competitivo direto
EPS: Exopolissacarídeo
FAdV: Adenovírus aviário
GEU: Erosão da moela e síndrome da ulceração
HE: Hematoxilina-eosina
His: Histamina
IBDV: Vírus da doença infecciosa da Bursa
IBV: Vírus da bronquite infecciosa
IFN I: Interferon do tipo I
IFNAR: Interferon alpha/beta receptor
IFN γ : Interferon γ
IgA: Imunoglobulina A
IHQ: Imuno-histoquímica
IL: Interleucina
IL17: Interleucina 17
IL6: Interleucina 6
ISH: Hibridização *in situ*
LT: Tissue lyser
mcr: Polimixina
NGS: Sequenciamento de nova geração
NLRs: Receptores semelhantes a NOD
NS: Proteína não estrutural
ORF: Open Reading frame
OTU: Unidade taxonômica operacional
PCR: Reação em cadeia da polimerase
Pro-IL18: pro-interleucina 18
Pro-IL1b: pro-interleucina tipo 1b
rDNA: DNA ribossômico
RNA: Ácido ribonucleico
RSS: Síndrome do definhamento e refugagem (em inglês *Runting and Stunting Syndrome*)
RT-PCR: Transcriptase reversa – reação em cadeia da polimerase
S: spike
SFB: Bactéria filamentosa segmentada
SFCA: Ácido graxos de cadeia curta

SGI: Sistema Gastrintestinal

SPF: Livres de patógenos específicos (em inglês *Specific pathogen-free*)

tetX : Tetraciclina

TH1: linfócitos T-helper 1

TH2: linfócitos T-helper 2

TLR: Receptor toll-like

Treg: linfócitos T regulares

VC: Capsídeo viral

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVOS	19
2.1. Gerais	19
2.2. Específicos	19
3. REVISÃO DE LITERATURA	19
3.1. Microbiota intestinal das aves de produção	19
3.2. Diversidade alfa e beta da microbiota intestinal	20
3.3. Microbiota e fisiologia intestinal	20
3.4. Composição da microbiota das aves	21
3.5. Composição da microbiota de acordo com a localização do sistema gastrointestinal	23
3.5.1. Papo, proventrículo e ventrículo.....	23
3.5.2. Intestino delgado	23
3.5.3. Ceco	24
3.1. Interação microbiota intestinal e sistema imune	25
3.2. Bactérias patogênicas	27
3.3. Disbiose da microbiota intestinal de aves causada por infecções virais	28
3.4. Principais fatores que interferem na composição da microbiota intestinal das aves comerciais	29
3.5. Uso de probióticos e o efeito na microbiota intestinal das aves de produção .	32
3.6. Importância da microbiota na nutrição em aves de produção	33
3.7. Síndrome do definhamento e refugagem em pintinhos frangos de corte	35
3.8. Agentes Etiológicos:	36
3.8.1. Rotavírus aviário	36
3.8.2. Astrovírus das galinhas.....	37
3.8.3. Parvovírus das galinhas	38
3.8.4. Reovírus.....	39
3.8.5. Vírus da bronquite infecciosa	40
3.8.6. Família Picornaviridae.....	41
3.9. Detecção dos vírus entéricos	43
3.10. Referência:	44
4. INTRODUÇÃO	62
4.1. Material e métodos:	64
4.1.1. Amostras	64
4.1.2. Sequenciamento genômico	66

4.1.3	Análise de bioinformática e estatística.....	67
4.2.	Resultados	67
4.2.1.	Dados do sequenciamento	67
4.2.2.	Composição taxonômica das bactérias dos pintinhos da propriedade 01.....	68
4.2.3.	Composição taxonômica das bactérias dos pintinhos da propriedade 02.....	69
4.3.	Discussão	69
4.4.	Conclusão	74
4.5.	Referências	85
5.	INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	91
5.1.	Anatomia do ventrículo	91
5.2.	Erosão da moela (ventrículo) e síndrome de ulceração	92
5.3.	Achados anatomopatológicos da GEU	92
5.4.	Fatores causadores ou predisponentes	93
5.4.1.	Fatores congênitos	93
5.4.2.	Privação de água e comida	93
5.4.3.	Deficiência nutricional	93
5.4.4.	Estresse	94
5.4.5.	Intoxicações	94
5.5.	Métodos de diagnóstico	95
5.6.	Material métodos.....	96
5.6.1.	Amostras e histologia	96
5.6.2.	PCR convencional do ventrículo	97
5.6.3.	Sequenciamento de alto rendimento.....	97
5.6.3.1.	Extração do DNA	97
5.6.3.2.	Sequenciamento genômico.....	98
5.6.3.3.	Análise de bioinformática e estatística.....	98
5.7.	Resultados	98
5.7.1.	Histórico e sinais clínicos	99
5.7.2.	Achados macroscópicos e histopatologia.....	100
5.7.2.1.	Dados do sequenciamento.....	104
5.7.2.2.	Composição taxonômica das bactérias.....	104
5.8.	Discussão	104
5.9.	Conclusão	107
5.10.	Referências.....	113

1. INTRODUÇÃO

A carne de frango de corte é uma das carnes mais consumidas mundialmente, devido à demanda atual por suprimentos de proteína seguros e de menor custo. De fato, em 2023, espera-se que a produção global de carne de frango aumente 3%. Estes dados demonstram que a avicultura é o subsetor agrícola que mais cresce. Por essa razão, os produtores têm sido historicamente levados a intensificar os sistemas agrícolas (Montoro-Dasi et al., 2021). Um intenso processo de produção de seleção realizado nas últimas 6 ou 7 décadas produziram frangos que convertem ração em massa muscular de forma eficiente, tornando-os um sistema eficaz para a produção de proteína de alta qualidade. A extração de energia e nutrientes dos alimentos requer interação entre as funções bioquímicas do frango e a microbiota presente no sistema gastrointestinal (SGI). Assim, a seleção da microbiota benéfica desempenha um papel importante na produção, saúde, proteção contra patógenos, desintoxicação e modulação do sistema imunológico (Clavijo e Flórez, 2018).

As doenças entéricas são causas relevantes de perdas econômicas na indústria avícola em todo o mundo. São caracterizadas por diarreia, atraso no crescimento e ganho de peso, além de mortalidade acima do normal (Saif, 2003; Kaithal et al., 2016). A síndrome do definhamento e refugagem (RSS, em inglês *runting stunting syndrome*) é uma doença entérica caracterizada por diarreia leve a moderada que resulta em atraso no crescimento, compromete o ganho de peso e causa deformidade das penas das aves acometidas (Kang et al., 2012; Kang et al., 2018). As lesões macroscópicas são caracterizadas por serosa do intestino delgado mais esbranquiçada que o normal, lúmen distendido e conteúdo aquoso, mucoide ou espumoso (Hauck et al., 2016). Na microscopia, a lesão característica foi denominada por alguns autores como enteropatia cística (Otto et al., 2006; Sellers et al., 2010).

A definição do agente viral ainda não foi completamente esclarecida, mas considerável número de vírus tem sido associado com a síndrome ou os sinais clínicos da doença, entre eles: astrovírus das galinhas (Kang et al., 2018), coronavírus (Hauck et al., 2016), parvovírus das galinhas (Zsak et al., 2013), reovírus aviário (Goodwich et al., 1993), rotavírus aviário (Otto et al., 2006; Pantin-Jackwood et al., 2008), gallivirus (de Oliveira et al., 2021), calicivírus (Wolf et al., 2011; Devaney et al., 2016), vírus da nefrite aviária (ANV) (Mandoki et al., 2006; Pantin-Jackwood et al., 2006; Pantin-Jackwood et al., 2008), vírus pertencentes às famílias Picornaviridae, Siphoviridae e Myoviridae (Devaney et al., 2016). No Brasil, recentemente a RSS foi descrita por Oliveira et al. (2021), onde foi associada a lesão histológica e a

identificação dos prováveis vírus em aves naturalmente infectadas. O sequenciamento de nova geração (NGS) e a hibridização *in situ* identificaram uma sequência do picornavírus que revelou semelhança genética com o gênero *Gallivirus* (de Oliveira et al., 2021).

Nos últimos anos a interação vírus-microbiota intestinal vem sendo investigada. Infecções intestinais em aves causadas por vírus é um dos principais fatores que causam disbiose e distúrbios da homeostasia imune, podendo resultar em infecções secundárias e pode envolver outros órgãos (Wickramasuriya et al., 2022). Pouco se sabe sobre o efeito da infecção viral na composição da microbiota intestinal de aves de produção, embora todas as evidências existentes de outros vertebrados sugeriram que patógenos virais podem influenciar a composição da microbiota intestinal para estabelecer infecções (Yitbarek et al., 2018). Vários estudos têm focado na investigação etiológica e patogênica da RSS, mas até o momento nenhum estudo avaliou as alterações da composição da microbiota do intestino delgado.

Outra doença gastrointestinal importante na avicultura de corte são as erosões do ventrículo que têm sido atribuídas principalmente a certos fatores nutricionais não infecciosos, por exemplo, deficiências de vitaminas, aminos biogênicas na farinha de peixe, estresse e micotoxinas (Gjevre et al., 2013). O envolvimento do adenovírus aviário (FAdV) na etiologia das erosões da moela foi descrito por Godwin et al. 1993, com base na detecção de corpúsculos de inclusão intranucleares característicos em células da mucosa do ventrículo com lesão. A erosão do ventrículo causa impacto econômico negativo, devido a diminuição significativa do ganho de peso semanal, diminuição do peso final e aumento da mortalidade total de lotes acometidos em comparação com frangos de corte saudáveis (Mirzazadeh et al., 2021). Surtos da erosão do ventrículo causada pelo FadV têm sido relatados em muitos países como Reino Unido, Polônia (Marek et al., 2010), Japão (Ono et al., 2003), Itália (Manarolla et al., 2009), Coreia do Sul (Lim et al., 2012) e Irã (Mirzazadeh et al., 2021). Ainda não há estudos associando a erosão do ventrículo em pintinhos do campo com desconforto ambiental e possíveis alterações da microbiota intestinal como consequência dessa condição.

2. OBJETIVOS

2.1. Gerais

O objetivo desse trabalho foi investigar as características da composição da comunidade bacteriana do íleo de frangos de corte naturalmente acometidos pela RSS e saudáveis, e investigar a microbiota intestinal de pintinhos com e sem erosão de moela.

2.2. Específicos

Pintinhos com RSS

1. Selecionar os pintinhos de corte com lesões histológicas de enterite viral características com RSS e os pintinhos de corte do mesmo lote sem RSS ou qualquer outra lesão histológica.
2. Avaliar a microbiota do íleo de pintinhos com RSS pela análise da região 16S rRNA.

Pintinhos com erosão no ventrículo

1. Avaliar peso, lesões macroscópicas e microscópicas em pintinhos de corte com atraso no crescimento e refugagem.
2. Avaliar a associação das lesões de erosão de ventrículo e a presença de genes do adenovírus aviário.
3. Avaliar a microbiota ileal de pintinhos com erosão de ventrículo pela análise da região 16S rRNA.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Microbiota intestinal das aves de produção

O sistema gastrointestinal das aves consiste em esôfago, inglúvio, proventrículo, ventrículo, intestino delgado, ceco, cólon e cloaca. Em relação ao comprimento do corpo, nas aves o intestino é mais curto que em mamíferos. A digesta passa por todo o sistema gastrointestinal rapidamente em um tempo médio de trânsito entre 4 e 5h (Pan e Yu, 2013; Clavijo e Flórez, 2018).

O sistema intestinal das aves abriga uma complexa e dinâmica comunidade microbiana consistindo principalmente de bactérias (Wei et al., 2013). A integridade do sistema gastrointestinal e da comunidade microbiana intestinal tem um papel vital na absorção de

nutrientes, desenvolvimento de imunidade e resistência a doenças. Alterações na microbiota intestinal podem ter efeitos adversos na eficiência alimentar, produtividade e saúde das aves (Shang et al, 2018). A composição da microbiota do sistema gastrointestinal reflete a coevolução entre os microrganismos que o habitam, interações genéticas, imunes e metabólicas com o hospedeiro e influência ambiental (Yeoman et al., 2012).

3.2. Diversidade alfa e beta da microbiota intestinal

A diversidade alfa é a diversidade de espécies microbianas encontradas em um local ou comunidade (Forney et al., 2004). Dois fatores principais, riqueza e uniformidade, devem ser levados em consideração ao medir a diversidade alfa das amostras. São realizados índices para descrevê-lo, a riqueza da comunidade é uma métrica para estimar o número total de espécies, incluindo o índice Chao 1, estimador de cobertura baseado em abundância (ACE) e espécies observadas (o número de diferentes unidades taxonômicas operacionais, OTUs, por amostra). A diversidade da comunidade é uma métrica de uniformidade relativa da comunidade, refletindo a riqueza e a uniformidade das espécies na amostra, incluindo o índice de Shannon e o índice de Simpson (Li et al., 2022).

A diversidade beta se refere a diversidade na composição das espécies entre diferentes amostras ou comunidades (Forney et al., 2004). É usado para comparar a diversidade entre as amostras com base na distância ou dis (similaridade) entre cada par de amostras. Ao comparar mais de duas amostras, é calculado para cada par e cria uma matriz de distância/dissimilaridade (Morgan e Hutterhower, 2012). A diversidade beta mensura como os membros da comunidade variam ao longo do tempo ou do espaço e é especialmente importante para encontrar tendências em um grande número de amostras (Hamady et al., 2010).

3.3. Microbiota e fisiologia intestinal

A existência da microbiota intestinal estimula a renovação e maturação das células epiteliais da mucosa intestinal, o desenvolvimento de redes capilares das vilosidades, a motilidade intestinal, a produção de dissacarídeos pelos enterócitos e o desenvolvimento da placa de Peyer (Willing e Van Kessel, 2007; Macari et al., 2014). Os microrganismos contribuem para a fermentação dos componentes dietéticos não digeríveis, metabolismos lipídico e energético, e a absorção de glicose pelo hospedeiro. Além de fornecer uma fonte extra de vitaminas e minerais, modulação da secreção de muco derivada do epitélio endógeno, além de contribuir para as várias funções da barreira da mucosa intestinal (Macari et al., 2014; Biasato et al., 2019). Compreender a ecologia e a função microbiana intestinal fornece uma

base científica sólida para melhorar a saúde intestinal, a conversão alimentar e o desempenho de aves de produção (Gong et al., 2006).

3.4. Composição da microbiota das aves

Pela utilização de análise do metagenoma e estatística das sequências do gene rRNA 16S recuperadas da microbiota intestinal de aves, vários trabalhos tem investigado a microbiota intestinal de aves de produção (Wei et al., 2013; Feye et al., 2020; Rychick et al., 2020; Zhou et al., 2021; Aruwa et al., 2021).

Foram estabelecidas 915 unidades taxonômicas operacionais (OTU), equivalente a espécie. Dos 13 filos bacterianos identificados, Firmicutes, Bacteroidetes e Proteobacteria foram os mais abundantes filos, respondendo por >90% de todas as sequências. No geral, 117 gêneros foram descritos, entre os quais *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Lactobacillus* e *Bacteroides* predominaram. Foi demonstrado alta prevalência do gênero *Ethanoligenes* (Firmicutes), que contém bactérias produtoras de etanol. Outros filos encontrados em pequena proporção incluíram Cyanobacteria, Spirochaetes, Synergistetes, Fusobacteria, Tenericutes e Verrucomicrobia. No ceco, os filos predominantes encontrados foram Firmicutes e Bacteroidetes, seguido por Proteobacteria e Actinobacteria, além de 31 gêneros do filo Firmicutes, dos quais *Ruminococcus*, *Clostridium*, e *Eubacteria* representaram > 5% das sequências (Wei et al., 2013; Feye et al., 2020; Rychick et al., 2020; Zhou et al., 2021; Aruwa et al., 2021).

Acredita-se que a colonização do sistema gastrointestinal comece imediatamente após a eclosão e, portanto, o ambiente de incubação tem uma grande influência no perfil microbiano das aves de produção (Stanley et al., 2013). Entre os animais de produção as aves apresentam uma influência parental marcadamente reduzida no desenvolvimento da microbiota pós-oviposição, pois os pintinhos são separados das matrizes reprodutoras (Stanley et al., 2014). Contudo, nos últimos anos, estudos estão sendo realizados para compreender se existe o estabelecimento e a herança da microbiota intestinal do embrião de aves. Pesquisadores encontraram 28 filos e 162 gêneros de bactérias no intestino de embriões. Entre os gêneros detectados, 68 também estavam presentes no intestino da matriz reprodutora desses embriões tais como *Halomonas*, *Lactobacillus*, *Bacteroides* e *Enterococcus*. Com esses resultados os autores sugerem que o estabelecimento e a herança da microbiota intestinal do embrião foram derivados da matriz reprodutora pelo processo de fertilização e formação do ovo no oviduto (Ding et al., 2017).

A microbiota intestinal dos pintinhos recém-eclodidos é influenciada por diversos fatores ambientais que contém uma grande variedade de bactérias, como a mão de tratadores humanos, material da cama, cama reutilizada, ração e caixas de transportes. A ampla variação da colonização do sistema gastrointestinal dessas aves pode ser uma consequência da alta diversidade de fontes bacterianas não aviárias (Stanley et al., 2013).

Inicialmente, a microbiota presente no sistema gastrointestinal é imatura e apresenta baixa diversidade (Macari et al., 2014). Estudos avaliaram as diferenças da comunidade da microbiota nos primeiros dias de vida das aves de produção, e foram identificadas diferenças entre 3, 7, 14, 28 e 49 dias de idade. Os resultados indicaram que ocorreram sucessões de uma comunidade bacteriana transitória para uma de complexidade crescente à medida que as aves envelheciam (Lu et al., 2003). Inicialmente, o intestino das aves é colonizado por aeróbios facultativos e posteriormente substituído por anaeróbios. A multiplicação prolífica e consumo de oxigênio por bactérias aeróbicas cria condições redutoras no ecossistema intestinal que promovem o subseqüente multiplicação e colonização por anaeróbios obrigatórios (Aruwa et al., 2021). Nos primeiros dias de vida a principal bactéria que predomina no intestino delgado é *Lactobacillus* (59%), sendo as demais relacionadas à família Clostridiaceae (11%) e aos gêneros *Streptococcus* (6,5%) e *Enterococcus* (6,5%). No ceco de frangos de corte de 4 dias de idade, proporções relativamente altas de *Salmonella* foram detectadas (40%) e *Campylobacter* estava presente em quantidades menores (2%). Quase um terço das bactérias no ceco de frango nessa idade consistiam em espécies de *E. coli* e *Clostridium* (Lu et al., 2003; Amit-Romach et al., 2004; Wei et al., 2013; Feye et al., 2020; Rychick et al., 2020; Zhou et al., 2021; Aruwa et al., 2021).

Outro estudo avaliou o ceco de aves livres de patógenos específicos *Specific pathogen-free* (SPF), com 14, 28 e 42 dias. Durante o curso de desenvolvimento do microbiota do intestino das aves SPF, entre os dias 14 e 28, Firmicutes, Proteobacteria e Bacteroidetes foram as principais bactérias, e Firmicutes aumentou significativamente com a idade. O gênero com maior abundância relativa foi *Lactobacillus*, seguido por *Faecalibacterium*. Além disso, enquanto a abundância de Ruminococcaceae, *Ruminococcus* e *Blautia* aumentou com a idade, *Lactobacillus*, Enterobacteriaceae e *Oscillospira* diminuíram com a idade. Os gêneros *Faecalibacterium* e *Enterococcus* apresentaram um aumento inicial entre os dias 14 e 28, seguido de uma diminuição entre os dias 28 e 42. As características da microbiota intestinal de frango SPF em diferentes idades estabelecem uma base para a regulação dessas bactérias

intestinais na fase inicial da criação, e também fornecem uma base teórica para o controle e prevenção de infecções e doenças avícolas em frangos recém-nascidos (Xi et al., 2019).

3.5. Composição da microbiota de acordo com a localização do sistema gastrointestinal

3.5.1. Papo, proventrículo e ventrículo

O segmento superior do sistema gastrointestinal das aves compreende o inglúvio, proventrículo e ventrículo. O inglúvio tem como função armazenar alimento e a fermentação, enquanto a digestão começa no proventrículo e ventrículo, o qual tritura alimentos mecanicamente e atua como uma barreira microbiana devido ao seu baixo pH (Stanley et al., 2014). A bactéria *Lactobacillus* é predominante em todo SGI superior. No inglúvio, são encontrados principalmente *L. salivarius* (Gong et al., 2007). Tanto no inglúvio quanto no ventrículo são encontradas várias espécies da família Clostridiaceae. A principal diferença entre esses dois órgãos é a presença no ventrículo de suco gástrico, pepsina e ácido clorídrico, o qual acidifica o meio, resultando em menor atividade bacteriana e menor atividade de fermentação (Clavijo e Flórez, 2018).

3.5.2. Intestino delgado

No intestino delgado há uma distribuição das comunidades bacterianas ao longo dos seus diferentes segmentos. Essa variação ocorre, devido as condições ambientais intrínsecas de cada porção (nível de nutrientes, pH, composição de gases, presença de sucos digestivos do hospedeiro, etc.). O duodeno apresenta características que mantêm a concentração bacteriana baixa, como alta concentração salina, grande variação do pH. Nessa porção o pH é mais ácido variando entre 5,7-6,4, há predominância dos *Lactobacillus*, podendo incluir alguns Clostridiales e enterobactérias em números bem menores (Gong et al., 2007; Macari et al., 2014). No jejuno ocorre a maior parte da digestão, com a ação das enzimas pancreáticas (lúmen) e de membrana (enterócitos), além da presença de grande maioria dos transportadores transepiteliais de nutrientes nesta porção do intestino delgado. O pH tende a ser mais alcalino do que no duodeno, variando consideravelmente ao longo de sua extensão (5,8-6,6) (Macari et al., 2014). O grupo de bactérias que predominam no jejuno são *Lactobacillus aviaries*, *L. salivarius*, *Candidatus Arthromitus* (Gong et al., 2017). O trânsito intestinal no jejuno é mais longo, ocorre a ação das enzimas pancreáticas e do suco biliar, liberando nutrientes para absorção nos enterócitos. Na presença de carboidratos estruturais provenientes da dieta, algumas linhagens degradadoras destes materiais, como *Ruminococcus*, podem ser detectadas

neste ambiente, aderidas às partículas alimentares, mesmo que as condições de pH ainda privilegiem as bactérias ácido-láticas (Macari et al., 2014).

O íleo é a porção final do intestino delgado, realiza absorção de nutrientes e reabsorção de sais biliares. As condições de pH são mais neutras (6,3-7,2) e, há maior produção de muco devido a maior quantidade de células caliciformes nessa região em relação ao duodeno e jejuno (Macari et al., 2014; Stanley et al., 2014). O íleo é dominado por *Lactobacillus* compreendendo 68,5% de sua microbiota (Lu et al., 2003). Algumas bactérias dominam o ambiente ileal nas três primeiras semanas de vida das aves, dentre eles estão *Lactobacillus acidophilus*, *Clostridium*, *Streptococcus*, produtoras de butirato e *Enterococcus* (Gong et al., 2002; Lu et al., 2003). Pesquisas experimentais demonstraram que espécies de *Lactobacillus* tornam-se predominantes em aves mais velhas conforme a microbiota amadurece (Lu et al., 2003). Um estudo mais recente, avaliou a microbiota presente no muco e no lúmen do íleo de frango de corte de 3 até 42 dias de idade. Nos três primeiros dias de vida o íleo apresentou baixa diversidade de bactérias com abundância de *Enterococcus* e *Escherichia* e baixa abundância de *Lactobacillus*. Nas outras fases do desenvolvimento (7-14 dias) ocorreu aumento acentuado de *Candidatus Arthromitus* no muco do íleo e de *Lactobacillus* no lúmen, e após esse período, *Lactobacillus* tornou-se o gênero mais abundante tanto no muco quanto no lúmen. O domínio da microbiota ileal por *Lactobacillus* foi uma característica transitória. Por volta de 42 dias de vida a abundância relativa de *Lactobacillus* diminuiu, enquanto uma variedade de outros táxons, incluindo *Escherichia*, *Turicibacter* e membros de Clostridiales aumentaram (Richards-Rios et al., 2020).

3.5.3. Ceco

O ceco das aves é um importante local de fermentação que influencia na saúde animal e desempenho dessas aves, sendo um ambiente de total anaerobiose e o conteúdo alimentar permanece por um tempo considerável. A microbiota cecal é capaz de realizar a digestão de alimentos ricos em celulose, amido e polissacarídeos resistentes. Ceco é o principal local de absorção de água e transporte e absorção de nutrientes (Stanley et al., 2014). Esta região é o principal local de fermentação microbiana no intestino dos frangos e, por isso, o único local onde é possível aproveitar parte dos carboidratos estruturais dietéticos não degradáveis pelas enzimas do animal (Macari et al., 2014). A densidade de células microbianas no ceco pode exceder 10^{11} por g de digesta (Wei et al., 2013) e a diversidade microbiana do ceco é maior, pois o tempo de trânsito de digesta é mais longo o que permite uma fermentação microbiana mais substancial (Yeoman et al., 2012). Os grupos mais abundantes encontrados no ceco são

Firmicutes (78%), seguidos de Bacteroidaceae (11%), Proteobacteria e Clostridiaceae, já os gêneros mais abundantes são *Ruminococcus*, *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Bacterioides*, *Eubacterium* e *Faecalibacterium* (Figura 1) (Zhu et al. 2002; Lu et al.2003, Wise et al. 2006, Gong et al. 2007; Stanley et al. 2013, Wei et al., 2013; Rychick et al., 2020; Feye et al., 2020).

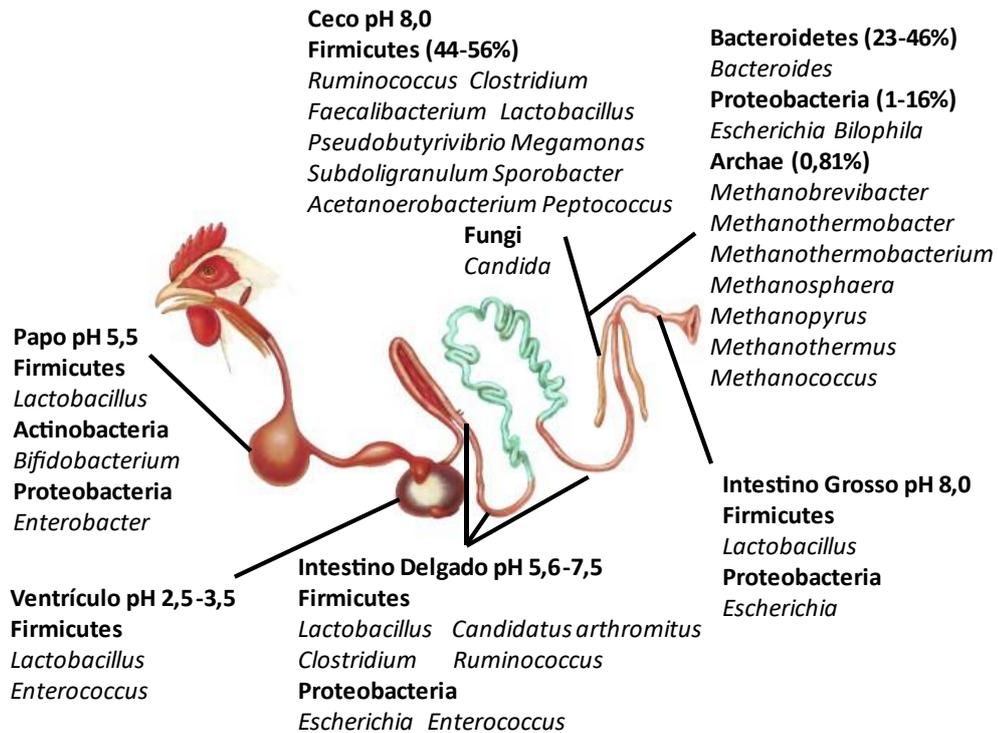


Figura 1: Principais táxons pesquisados ao longo do sistema gastrointestinal de aves de produção. Adaptado por Yeoman et al. 2012; Feye et al. 2020; Rychick et al., 2020; Zhou et al., 2021; Aruwa et al. 2021.

3.1. Interação microbiota intestinal e sistema imune

O sistema imunológico das aves inclui tanto a resposta imune inata quanto a adaptativa. A microbiota tem um papel importante modulando a regulação e a ativação de ambos os elementos (Clavijo e Flórez, 2018). O sistema imunológico intestinal inclui uma camada mucosa robusta, células epiteliais intestinais fortemente interconectadas, imunoglobulina A (IgA) e peptídeos antimicrobianos (Oakley et al., 2014). A mucosa intestinal é considerada a primeira linha de defesa contra infecção, além disso, é uma barreira que impede que a microbiota comensal penetre o epitélio intestinal (Clavijo e Flórez, 2018). Muitos mecanismos são empregados para alcançar a compartimentalização da microbiota. Uma densa camada de muco separa o epitélio intestinal da microbiota residente. As células caliciformes são responsáveis pela produção de mucinas glicoprotéicas que formam as camadas de muco e essas

mucinas podem ser ligadas à membrana ou secretadas (Chen et al., 2015). A densidade das células caliciformes, encontradas em todo o intestino, aumenta distalmente, o que aparentemente reflete o aumento das populações microbianas (Broom e Kogut, 2018). As junções de oclusão presentes entre as células epiteliais do intestino são uma estrutura crítica na restrição da permeabilidade transepitelial. As bactérias emitem sinais por meio do metabólito indol que promovem o fortalecimento da barreira epitelial para a regulação positiva das junções de oclusão e proteínas associadas ao citoesqueleto. Além disso, as imunoglobulinas A (IgA) e peptídeos antimicrobianos (AMPs) mantêm a função de barreira da mucosa. Acredita-se que as células dendríticas intestinais desempenhem um importante papel na compartimentalização da microbiota entérica, por meio de mecanismos que envolvem amostragem de bactérias intestinais para apresentação de antígenos (Zheng et al., 2020).

Receptores de reconhecimento de padrão (PRRs), como receptores toll-like (TLRs), na membrana de células epiteliais e células linfoides do intestino delgado, estão envolvidos no reconhecimento diferencial e são responsáveis pelo desenvolvimento do sistema imunológico da mucosa normal do intestino. Os TLRs identificam vários padrões moleculares associados a micróbios (MAMPs), incluindo diferentes antígenos bacterianos (por exemplo, lipopolissacarídeos, polissacarídeos capsulares, ácido murâmico, peptidoglicano, flagelina) e ativam a resposta imune intestinal inata (Al-Rashidi, 2022).

A microbiota intestinal controla a expansão de subconjuntos de linfócitos específicos em aves que parece ser homólogo a mamíferos. A célula T helper 17 (TH17) é uma linhagem específica de células TH CD4+. A célula TH17 é essencial para a defesa do hospedeiro e é um mediador chave na progressão da doença autoimune através da produção de citocinas pró-inflamatórias, IL17A, IL 17F e IL-22. As atividades biológicas da IL-17 como uma citocina produzida por células Th17 incluem recrutamento de neutrófilos, estimulação da produção de peptídeos antimicrobianos, como β -defensinas e mucinas, bem como a indução de citocinas e quimiocina. O papel exato das células Th17 em aves é pouco compreendido devido à falta de reagentes imunológicos (Kim et al., 2019). Em mamíferos, o intestino possui populações de células Th17 funcionalmente diferenciadas e sua propensão inflamatória é amplamente determinada por bactérias distintas que provocam sua diferenciação. As células Th17 induzidas por bactérias filamentosas segmentadas (SFB) não são inflamatórias, enquanto as células Th17 induzidas por *Citrobacter* são uma fonte potente de citocinas inflamatórias. A ligação do SFB ao epitélio hospedeiro estimula a expressão da proteína amiloide A sérica, que induz células dendríticas (DCs) da lâmina própria que expressam CD11 a liberar IL6 e IL23 que

posteriormente induzem a diferenciação de células TH17 (Omenetti et al., 2019; Zheng et al., 2020).

Diferentes membros de *Lactobacillus* ativam células dendríticas que induzem a produção de diferentes citocinas inflamatórias que desempenham um importante papel na modulação de Th1 e Th2 e ativam células *natural killer* (Kogut, 2013). O sistema imunológico intestinal precisa de estimulação microbiana para o desenvolvimento e regulação adequados, como ativação específica da imunidade da mucosa do hospedeiro, que evita o supercrescimento inadequado ou a translocação de membros da microbiota. O resultado final é a homeostase fisiológica, onde a microbiota promove a função imunológica normal no intestino (Kogut et al., 2020).

3.2. Bactérias patogênicas

A microbiota intestinal das aves de produção contém vários táxons capazes de causar doenças significativas em humanos, principalmente *Campylobacter* spp. e *Salmonella* spp. As infecções gastrointestinais em humanos causadas por *Campylobacter* spp. e *Salmonella* spp. estão principalmente associadas ao consumo de produtos da cadeia avícola e por esta razão o controle de patógenos da granja é de grande importância. *Campylobacter* spp. é reconhecido como um gênero não patogênico no hospedeiro aviário. Já a *Salmonella enterica*, pode causar doença em galinhas, dependendo da idade, estado imunológico e tipo de sorovar (Oakley et al., 2014; Clavijo e Flóres, 2018).

Escherichia coli é uma gamaproteobactéria presente no intestino, encontrada em baixa abundância durante todo o ciclo de vida da ave de produção saudáveis. No entanto, apenas certas linhagens dessa bactéria têm fatores de virulência específicos que podem causar doenças em aves; essas linhagens são conhecidas como *E. coli* aviária patogênica (*Avian pathogenic E. coli* - APEC) (Clavijo e Flóres, 2018). APEC utiliza diferentes fatores de virulência, principalmente adesinas, invasinas, protectinas, sistemas de aquisição de ferro e toxinas. Esses fatores facilitam a adesão, invasão, evasão das respostas imunes do hospedeiro, colonização, proliferação e disseminação sistêmica da APEC, permitindo assim o estabelecimento da infecção em aves de produção (Kathayat et al, 2021). *E. coli* também é considerada uma bactéria zoonótica potencialmente patogênica em humanos. A microbiota intestinal, incluindo *E. coli*, pode atuar como um reservatório para a disseminação da resistência a antibióticos em outras bactérias patogênicas, como *Salmonella* spp. (Oakley et al., 2014; Clavijo e Flóres, 2018).

A população clostridial inclui algumas espécies patogênicas para aves de produção tais como *Clostridium perfringens*, *C. septicum*, e *C. colinum* (Oakley et al., 2014). *Clostridium perfringens* é um bastonete gram-positivo anaeróbico facultativo formador de esporos, mais conhecido por produzir um arsenal de mais de 20 toxinas extracelulares que contribuem para a fisiopatologia de uma série de doenças histotóxicas e enterotóxicas como a enterite necrótica em aves de produção (Lepp et al., 2021). Alguns fatores podem predispor as aves de produção a contraírem a doença; estes incluem danos à mucosa e dietas com altos níveis de polissacarídeos solúveis não amiláceos. Além disso, *C. perfringens* é um patógeno para seres humanos transmitido por alimentos e tem origens diferentes, incluindo alimentos de origem aviária (Clavijo e Flórez, 2018).

3.3. Disbiose da microbiota intestinal de aves causada por infecções virais

A disbiose é definida como alteração na composição das comunidades comensais residentes do intestino em relação àquelas encontradas em indivíduos saudáveis, frequentemente é descrita como um aumento em espécies potencialmente patogênicas, diminuição de organismos considerados benéficos ou diminuição da diversidade alfa (Harper et al., 2021). Infecções intestinais em aves causadas por vírus é um dos principais fatores que causam disbiose e distúrbios da homeostasia imune, podendo resultar em infecções secundárias e pode envolver outros órgãos (Wickramasuriya et al., 2022).

Pesquisadores realizaram inoculação do vírus da influenza aviária (AIV) H9N2 em aves SPF com nove dias de idade e avaliaram a microbiota e a resposta inflamatória do íleo dessas aves (Li et al., 2018). Neste estudo, foram identificados níveis elevados de interferon gama (IFN γ) e IL-17A, além de disbiose da microbiota comensal com diminuição do número de bactérias produtoras de ácido láctico, como *Lactobacillus*, *Enterococcus* e *Streptococcus*, e um aumento da população de Proteobacterias patogênicas como *Escherichia coli* (Li et al., 2018). Outro estudo obteve o mesmo resultado com aumento da abundância do filo Proteobacteria após a inoculação de AIV H9N2 em aves SPF, demonstrando que a mudança da microbiota intestinal e a interrupção da homeostase microbiana do hospedeiro no intestino que pode ser um dos mecanismos pelos quais a infecção pelo vírus influenza é estabelecida nas aves de produção (Yitbarek et al., 2017).

Em outro estudo, os autores avaliaram o perfil da microbiota intestinal inicial no duodeno e ceco de pintos ao nascimento (1 dia de idade) e a disbiose de bactérias associadas à

infecção pelo vírus a doença de Newcastle. Os resultados foram o aumento tanto no duodeno quanto no ceco de membros da microbiota como Sinobacteracea e *Rhodoplanes* e diminuição de membros como Xanthomonadaceae e Cytophagacea (Cui et al., 2018). O gênero *Rhodoplanes* pode ser um patógeno envolvido em condições febris desconhecidas e pode causar infecção local de quaisquer tecidos ou órgãos (Zhang et al., 2011; Cui et al., 2018).

O vírus da doença infecciosa da Bursa (IBDV) causa linfólise em tecidos linfóides primários como bolsa cloacal e imunodepressão em tecido linfóide associado ao intestino (Abaidullah et al., 2019). Pesquisadores investigaram o efeito da infecção do IBDV na composição da microbiota de frangos de corte e observaram uma diminuição na abundância do membro *Clostridium XIVa*, que são reguladores de linfócitos Treg colônicos, e o aumento de *Faecalibacterium*, cuja função em aves é desconhecida, mas em humanos demonstra ser um marcador de saúde intestinal, pois desordens intestinais levam a uma alteração dessa população de bactérias (Kubasova et al., 2018).

Nos últimos anos alguns estudos investigaram o papel da microbiota intestinal contra infecções virais sistêmicas (Bavananthasivam et al., 2021; Yin et al., 2022). Um desses estudos utilizou o vírus da bronquite infecciosa nefropatogênica (IBV) como modelo de infecção para descrever o impacto da microbiota de aves SPF tratadas com antibiótico, cuja microbiota sofreu depleção (Yin et al., 2022). Os resultados mostraram uma resposta imune inata diminuída, acompanhada por menor ativação de macrófagos após a infecção por IBV, o que está relacionado à diminuição da expressão de genes estimulados por interferon (ISGs) no sangue periférico e no baço. Além disso, *Lactobacillus* foi inoculado nas aves tratadas com o antibiótico, o que lhes permitiu induzir a expressão de IFN-I em macrófagos por meio de seu metabólito exopolissacarídeo (EPSs), recuperando a capacidade de resistir à infecção nefropatogênica por IBV (Yin et al., 2022).

3.4. Principais fatores que interferem na composição da microbiota intestinal das aves comerciais

A composição da microbiota é influenciada por vários fatores, dentre esses, a genética do hospedeiro. A existência da diferença na fisiologia entre aves de aptidão para postura e de aptidão para corte resultou em uma discrepância no crescimento desses animais, com um peso corporal médio de galinhas poedeiras de 450 g em comparação com 2.800 g às 6 semanas de idade em frangos de corte (Kers et al., 2018). Um estudo investigou as diferenças na

composição e função da microbiota cecal de frangos de corte comercial no dia do abate e galinhas poedeiras com 120 dias. Neste estudo, Firmicutes e Bacteroidetes dominaram os microbiomas dos frangos de corte e poedeiras no nível de filo, mas houve diferenças na abundância. A nível de gênero, poedeiras tiveram maior abundância de *Bacteroides* enquanto os frangos de corte tiveram maior abundância de *Alistipes*. A análise do perfil de funções microbianas demonstrou que o metabolismo de carboidratos, metabolismo lipídico, metabolismo de aminoácidos e biossíntese e metabolismo de glicanos foram significativamente mais abundantes em poedeiras do que em frangos de corte (Qi et al., 2019).

Além da genética, as diferenças das linhagens de aves de mesma aptidão também apresentam variação na composição da microbiota. Foram compilados dados de estudos do sequenciamento do gene rRNA 16S de amostras cecais que estavam disponíveis para duas linhagens de frangos de corte. O filo Actinobacteria está presente em todos os quatro estudos com a linhagem Cobb (100%) e em três de oito estudos com a linhagem Ross (38%) e o filo Bacteroides está presente em todos os quatro estudos com Cobb (100%) e em seis de oito estudos com Ross (75%). Esses resultados sugerem que a linhagem influencia na composição da microbiota, além disso, é provável que os frangos de corte Cobb e Ross tenham uma exposição diferente à microbiota devido a diferenças no lote parental ou devido as diferenças nas respostas imunes causadas pela diferença genética (Schokker et al., 2015; Kers et al., 2018).

Estudos foram realizados comparando a microbiota de linhagens de aves comerciais (VenCobb 400, Cobb400, Ross 308) com raças de aves de produção de origem indiana (Kadaknath, Aseel, Ghagus e Nicobari). As análises de metagenômica evidenciaram diferenças na composição e na abundância da microbiota das duas categorias de aves avaliadas (Pandini et al., 2018; Paul et al., 2021). Os autores concluíram que a descrição da variação entre linhagens comerciais globais e raças de origem indiana oferecem um painel de fenótipos da microbiota que podem ser passíveis de seleção genética para uso no melhoramento da raça (Pandini et al., 2018).

Outro fator que pode influenciar na comunidade da microbiota comensal das aves de produção é o gênero. Os frangos machos têm melhor desempenho de crescimento do que as fêmeas sob o mesmo histórico genético e dieta (Cui et al., 2021). Um estudo comparou a microbiota cecal de aves machos e fêmeas com aptidão ao corte de mesma linhagem, na mesma dieta e mesma idade. Os resultados revelaram que os gêneros *Bacteroides* e *Megamonas* foram mais abundantes nos frangos machos. A microbiota cecal dos machos indicou uma relação mais

próxima com o metabolismo de glicanos, enquanto nas fêmeas esteve mais relacionada com o metabolismo lipídico. Esses achados revelaram a associação do desempenho de crescimento das aves com a microbiota cecal que contribuíram para o metabolismo de glicanos e lipídios de maneira dependente do gênero (Cui et al., 2021).

O uso de antimicrobianos na avicultura pode influenciar a composição da microbiota intestinal, na década de 1940 foram introduzidos na alimentação para acelerar o crescimento animal, o que desempenhou um papel significativo na formação e expansão da pecuária em sua escala atual. A produção intensiva de alimentos de origem animal sustentou a crescente demanda global por proteína animal, mas também levantou preocupações sobre a seleção para resistência antimicrobiana (Plata et al., 2022).

O efeito dos antimicrobianos no sistema gastrointestinal das aves de produção causa uma redução na estabilidade da microbiota e também leva a uma redução da população de *Lactobacillus* no intestino (Clavijo e Flórez, 2018).

Pesquisadores evidenciaram o efeito do coccidiostático monensina e os promotores de crescimento virginiamicina e tilosina na microbiota cecal de frangos de corte. A monensina causou um efeito de depleção de membros como *Roseburia*, *Lactobacillus* e *Enterococcus* e aumento de *Coprococcus* e *Anaeroflum*. Outro resultado importante foi o enriquecimento da população de *E. coli* nos tratamentos monensina/virginiamicina e monensina/tilosina, mas não no tratamento somente com monensina (Danzeisen, 2011).

O uso de antimicrobianos na pecuária convencional contribui para o surgimento e disseminação da resistência antimicrobiana em populações bacterianas. A administração de antimicrobianos por meio de ração e água potável para um grande número de animais de uma só vez, pode ter contribuído para a redução da eficácia terapêutica de alguns antimicrobianos e geração de bactérias multirresistentes. Frangos abrigam bactérias, incluindo patógenos humanos, resistentes a várias classes de antimicrobianos, alguns dos quais são listados como antimicrobianos de importância crítica pela Organização Mundial da Saúde, como amoxicilina do qual pertence a classe dos β -lactâmicos (Laconi et al., 2022). Foi realizado um estudo para catalogar os genes de resistência a antibióticos (resistomas) no intestino de frangos. A análise identificou *Escherichia coli*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Klebsiella* e *Lactobacillus* como os principais hospedeiros dos genes de resistência tetX (tetraciclina), mcr (polimixina), e blaNDM (betalactamase). Os pesquisadores sugeriram que *Lactobacillus* pode potencialmente

atuar como um reservatório de genes de resistência a antibióticos e podem desempenhar um papel ativo na transferência desses genes para humanos através da cadeia alimentar (Yang et al., 2022).

3.5. Uso de probióticos e o efeito na microbiota intestinal das aves de produção

Os probióticos são microrganismos vivos que conferem uma ampla variedade de benefícios aos animais, tais como estimulação da resposta imune, manutenção da função da barreira intestinal e prevenção da invasão de patógenos no intestino (Leeson et al., 2012; Yeoman et al., 2012; Kyoung Oh et al., 2017). Para um microrganismo ser considerado um probiótico, devem possuir algumas características: ter a capacidade de aderir às células epiteliais, capacidade de colonizar e reproduzir-se no hospedeiro, capaz de sobreviver à passagem pelo sistema gastrointestinal; resistente à acidez gástrica e ao conteúdo da bile; produzir metabólitos que inibem ou matam bactérias patogênicas. Além disso, deve permanecer viável sob condições de processo, produção e armazenamento (Kabir, 2009; Clavijo e Flórez, 2018). Os probióticos podem influenciar o sistema imune no aumento dos níveis de citocinas e anticorpos, estimular a capacidade da microbiota de produzir butirato, além disso reduz e prevenir a colonização por patógenos entéricos por exclusão competitiva e produção de substâncias bacteriostáticas e bactericidas (Wei et al., 2013; Pan e Yu, 2014; Clavijo e Flórez, 2018).

Pesquisadores investigaram em frangos de corte, de um dia de idade, a suplementação de *Bacillus subtilis* em animais desafiados com *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar Gallinarum, aos 32 dias, comparados com grupo de aves que não receberam a suplementação do probiótico. As aves desafiadas suplementadas com probiótico apresentaram uma abundância do filo Firmicutes (>80%) seguida por Bacteroidetes e Proteobacteria, além do gênero *Lactobacillus*, enquanto o grupo sem suplemento teve aumento do filo Proteobacteria, gêneros *Turicibacter*, *Enterobacteriaceae* não classificada, *Bacteroides* e diminuição de Firmicutes e do gênero *Lactobacillus*. Esses resultados mostram que a suplementação com *B. subtilis* aumentou a abundância de microrganismos benéficos contribuindo para a saúde intestinal (Kyoung Oh et al., 2017).

Outro estudo avaliou o efeito da suplementação probiótica com *Lactobacillus acidophilus* em frangos de corte desafiados com *Clostridium perfringens* tipo A. A administração de *L. acidophilus* teve um efeito significativo no aumento da abundância de bactérias benéficas como *Lactobacillus* e elevação na concentração de lactato e butirato e

diminuição da abundância relativa de patógenos como *Escherichia-Shigella*. No grupo desafiado com *C. perfringens* sem suplementação probiótica o resultado foi contrário. Esses resultados sugerem que o probiótico utilizado ajuda a restaurar a comunidade microbiana interrompida pela infecção por *C. perfringens* (Li et al., 2017).

3.6. Importância da microbiota na nutrição em aves de produção

Os carboidratos da dieta mais facilmente digeríveis são digeridos e absorvidos pela ave no intestino delgado, os carboidratos indigestíveis e carboidratos residuais são digeridos pelas bactérias que residem no intestino grosso (Pan e Yu, 2014). O microbioma produz enzimas capazes de degradar polissacarídeos da dieta. Essas enzimas são essenciais para as aves comerciais que não possuem os genes para as enzimas glicosídeo hidrolase, polissacarídeo lipase e carboidrato esterase, que são necessárias para facilitar este processo de degradação dos polissacarídeos (Yeoman et al., 2012). Essas bactérias hidrolisam polissacarídeos indigeríveis, oligossacarídeos e dissacarídeos que podem então ser fermentados pelas bactérias intestinais, produzindo SCFAs, principalmente acetato, propionato e butirato (Pan e Yu, 2014). O acetato é o principal SCFA produzido em aves seguido pelo propionato e butirato. As concentrações de butirato são de particular significado fisiológico, uma vez que este SCFA é a fonte de energia primária do epitélio do cólon e é essencial para a homeostase dos colonócitos e o desenvolvimento da morfologia das vilosidades intestinais (Yeoman et al., 2012). Os SCFAs podem regular o fluxo sanguíneo intestinal, estimular o crescimento e a proliferação de enterócitos, regular a produção de mucina e modular as respostas imunes intestinais (Pan e Yu, 2014).

A microbiota do ceco desempenha um papel no metabolismo do nitrogênio do hospedeiro, que está altamente associado à eficiência das aves em extrair energia dos alimentos. O ácido úrico e as fezes misturados na cloaca podem ir para o ceco devido ao peristaltismo retrógrado, onde a bactéria converte o ácido úrico em amônia, que é utilizado pelo hospedeiro para sintetizar aminoácidos como a glutamina (Bindari e Gerber, 2021). A maioria das proteínas e vitaminas produzidas por essas bactérias são perdidas durante a excreção, pois a maioria das bactérias intestinais são encontradas no ceco e este órgão é incapaz de digerir ou absorver proteínas (Clavijo e Flórez, 2018). A utilização de proteínas bacterianas é possível quando os frangos são alojados em pisos duros, onde a coprofagia (ingestão de fezes) pode ocorrer e as proteínas bacterianas podem ser digeridas e absorvidas no intestino delgado (Pan e Yu, 2013).

As aves, de maneira recíproca, podem fornecer nutrientes às bactérias intestinais. No caso, a mucina produzida por células caliciformes no intestino é uma importante fonte de carbono, nitrogênio e energia para bactérias comensais e patógenos semelhantes (Clavijo e Flóres, 2018). A presença de bactérias degradadoras de mucina está associada à saúde intestinal, pois exercem pressão seletiva sobre bactérias que não podem aderir à superfície da mucosa. As bactérias que podem degradar mucinas, inclui algumas espécies de *Bifidobacterium*, *Bacteroides* e *Akkermansia muciniphila*, as quais são capazes de se fixar à camada de muco e secretar enzimas específicas para a degradação da mucina (Pan e Yu, 2014).

A dieta tem uma influência importante na composição da microbiota intestinal e ambos, a composição da dieta e a forma física do alimento (pellet ou triturada), influenciam a digestibilidade e a absorção de nutrientes no intestino (Bindari e Gerber, 2021). Frangos de corte alimentados com ração à base de trigo na forma de *pellets*, apresentam aumento da concentração de coliformes e enterococos no íleo e *C. perfringens* no ceco em comparação com a mesma ração na forma de farelo (Engberg et al., 2002). Comparado ao trigo moído na forma de *pellets*, a alimentação com trigo integral resultou na redução de *C. perfringens* e enterobactérias negativas para lactose e aumento do número de *Bifidobacterium* e diversidade bacteriana no ceco (Engberg et al., 2004; Bindari e Gerber, 2021). Altos níveis de *Lactobacillus* spp. foram encontrados em todo o sistema intestinal em frangos alimentados com trigo integral em comparação com frangos alimentados com *pellets* de trigo moído (Engberg et al., 2004).

O trigo é um grão de menor digestibilidade pelo animal, e acaba sendo substrato para fermentação das bactérias benéficas que, em grande quantidade, inibem linhagens de bactérias indesejáveis (Macari et al., 2014). O sorgo adicionado na dieta quando o animal é jovem, cria uma película sobre a mucosa, ajudando na proteção contra patógenos; porém, quando fornecido por um longo período gera maior descamação da mucosa e, com isso, menor capacidade do hospedeiro em responder a colonização por patógenos, colaborando com sua proliferação. Fatores como a aderência das bactérias às partículas do grão no lúmen e diferenças na facilidade de degradação pelas enzimas do animal podem estar ligados a estes resultados (Macari et al., 2014).

Galinhas alimentadas com uma dieta à base de centeio apresentaram níveis aumentados de coliformes no duodeno e íleo e níveis aumentados de bactérias lácticas no ceco, duodeno e íleo em comparação com galinhas alimentadas com uma dieta à base de milho (Tellez et al., 2014). Dietas com altos níveis de polissacarídeos não digeríveis, hidrossolúveis e não amiláceos, farinhas de peixes e farinhas de carnes, tem sido associadas com o aumento da

proliferação de *C. perfringens*, predispondo à enterite necrótica das aves (Timbermont et al., 2011; Bindari e Gerber, 2021). Alguns desses efeitos podem estar relacionados a diferenças na viscosidade da digesta, e diminuição da digestibilidade dos nutrientes. Além disso, dietas ricas em proteínas contendo concentrações relativamente altas de proteínas pouco digeríveis levam a um prolongamento do tempo de trânsito intestinal, cujos fatores fornecem substrato e facilita a colonização de bactérias patogênicas no intestino delgado, incluindo *C. perfringens* (Timbermont et al., 2011).

3.7. Síndrome do definhamento e refugagem em pintinhos frangos de corte

Doenças entéricas têm sido descritas em pintinhos, com perdas econômicas relevantes. São caracterizadas por diarreia, atraso no crescimento e no ganho de peso, além do aumento de mortalidade (Saif, 2003; Kaithal et al., 2016). Apesar da existência de várias pesquisas para elucidar a causa da doença entérica, os agentes não foram completamente definidos (Kim et al., 2020).

No final dos anos 70 foram documentados os primeiros relatos de uma doença em frangos jovens caracterizada notavelmente por pesos corporais reduzidos. Desde então, numerosas publicações relatam essa doença que implica na redução do ganho de peso em pintinhos (Montgomery et al., 1997; Hauck et al., 2016). Esta condição recebeu diferentes denominações como enterite coronaviral, síndrome de má digestão, síndrome de má absorção, síndrome do definhamento e refugagem e enterite viral (Kaithal et al., 2016).

A RSS é uma doença entérica caracterizada por diarreia leve a moderada que resulta em atraso no crescimento, compromete o ganho de peso e causa deformidade das penas das aves acometidas (Kang et al., 2012; Kang et al., 2018). As lesões macroscópicas são caracterizadas por serosa do intestino delgado mais esbranquiçada que o normal, lúmen distendido e conteúdo aquoso, mucoide ou espumoso (Hauck et al., 2016). Na microscopia, a lesão característica foi denominada por alguns autores como enteropatia cística (Otto et al., 2006; Sellers et al., 2010). Esta lesão ocorre porque as células que revestem as criptas sofrem necrose com desprendimento e acúmulo no lúmen, causando dilatação e o epitélio de revestimento torna-se achatado. A gravidade dos sinais clínicos pode depender da extensão da atrofia das vilosidades resultante da perda epitelial e diminuição da renovação celular (Zekarias et al., 2005). A definição do agente viral e a patogênese das lesões intestinais ainda não foram completamente esclarecidas; no entanto, o aumento da apoptose das células epiteliais que revestem as vilosidades e criptas tem sido relatado (Zekarias et al., 2005; Kang et al., 2012).

A etiologia da RSS foi relacionada a uma variedade de agentes virais, tais como parvovírus das galinhas (ChPV) (Zekarias et al., 2005; Bidin et al., 2011; Palade et al., 2011; Zsak et al., 2013; Mettifogo et al., 2014; Koo et al., 2015; Devaney et al., 2016), reovírus (ARV) (Goodwin et al., 1993; Montgomery et al., 1997; Pantin-Jackwood et al., 2008; Banyai et al., 2011; Rios et al., 2012; Davis et al., 2013; Mettifogo et al., 2014; Devaney et al., 2016), rotavírus aviário (AvRV) (Otto et al., 2006; Pantin-Jackwood et al., 2008; Otto et al., 2012; Rios et al., 2012; Mettifogo et al., 2014), astrovírus das galinhas (CAstV) (Pantin-Jackwood et al., 2006; Smyth et al., 2009; Todd et al., 2009; Smyth et al., 2010; Canelli et al., 2012; Kang et al., 2012; Mettifogo et al., 2014; Devaney et al., 2016), vírus da bronquite infecciosa das galinhas (IBV) (Montgomery et al., 1997; Mettifogo et al., 2014; Devaney et al., 2016; Hauck et al., 2016) e vírus da nefrite aviária (ANV) (Mandoki et al., 2006; Pantin-Jackwood et al., 2006; Pantin-Jackwood et al., 2008; Hewson et al., 2010; Canelli et al., 2012; Mettifogo et al., 2014; Devaney et al., 2016), birnavírus (Marguerie et al., 2011; Noiva et al., 2015), calicivírus (Wolf et al., 2011; Devaney et al., 2016), adenovírus (Roussan et al., 2012; Mettifogo et al., 2014) e outros vírus pertencentes às famílias Picornaviridae, Siphoviridae e Myoviridae (Devaney et al., 2016), tem sido implicado.

3.8. Agentes Etiológicos:

3.8.1. Rotavirus aviário

O Rotavírus aviário é um dos principais agentes etiológicos das enterites virais em humanos e em outros mamíferos (Franco e Greenberg, 2009). O Rotavírus humano foi identificado pela primeira vez em 1973 (Bishop et al., 1973). Esse vírus também infecta aves, numerosas pesquisas sobre a incidência do vírus têm demonstrado que lotes de aves comerciais são frequentemente infectadas (Rios et al., 2012; Otto et al., 2006; Pantin-Jackwood et al., 2007; Reynolds et al., 1987; Takase et al., 1990). O rotavírus das aves foi identificado em 1977 nos Estados Unidos por microscopia eletrônica (Bergeland et al., 1977).

O Rotavírus aviário pertence à família Reoviridae, não envelopado, esférico com o diâmetro de aproximadamente 70nm. O genoma é delimitado por um capsídeo de camada tripla com aparência característica de “roda” quando visto por microscopia eletrônica. O genoma é composto por 11 segmentos lineares de RNA de fita dupla. Cada segmento de RNA consiste em um Open Reading Frame (ORF) que codifica uma única proteína. A replicação e montagem dos rotavírus ocorre no citoplasma com partículas virais frequentemente encontradas dentro de vacúolos (Guy, 1998).

Com base nos sítios antigênicos localizados no capsídeo interno da proteína VP6, os rotavírus foram classificados em oito grupos (A- H) (Estes & Cohen 1989; Estes & Kapikian, 2007). Os grupos A e D tem sido relatados predominantemente em várias espécies de aves doentes, enquanto o grupo F e G tem sido relatado ocasionalmente (Otto et al., 2006; 2012; Kindler et al., 2013; Beserra e Gregori, 2014). A principal manifestação clínica da doença causada por estes vírus é diarreia, diminuição do ganho de peso, desidratação e aumento da mortalidade (McNulty, 1997). O primeiro relato que sugeriu o envolvimento do rotavírus grupo D na RSS foi em aves comerciais de campo entre 5 a 14 dias. As técnicas utilizadas foram PCR, microscopia eletrônica e histologia. Nestas aves foram observados sinais de RSS e atrofia intensa das vilosidades intestinais (Otto et al., 2006).

A transmissão do rotavírus é oro-fecal sendo eliminado pelas fezes (McNulty, 1997). Não há relatos da transmissão vertical até o momento (Dhama et al., 2015). A replicação do rotavírus ocorre no epitélio maduro das vilosidades do intestino delgado (McNulty, 1997). O pico máximo de excreção do vírus ocorre nas fezes 2 a 5 dias após a infecção (McNulty, 1983). A diarreia ocorre devido a destruição de enterócitos das vilosidades e devido a substituição por células epiteliais imaturas das criptas (Moon, 1978). Conseqüentemente, há falta das dissacaridases e piora na capacidade de absorção resultando em diarreia, devido ao efeito de malabsorção e má digestão (Moon, 1978). Ainda não foi desenvolvida uma vacina comercial contra rotavírus aviário, devido à dificuldade da alta variação antigênica do vírus (Dhama et al., 2015).

3.8.2. Astrovírus das galinhas

Os astrovírus são vírus pequenos, redondos e não envelopados, com sentido positivo, genoma de RNA de fita simples e pertencem a família Astroviridae (Kang., 2018). Este vírus tem sido associado com enterite aguda em mamíferos e aves incluindo perus e pintinhos; hepatite letal em patos, síndrome do “pintinho branco” e nefrite em galinhas (Schultz-Cherry, 2013). Em galinhas, há várias astrovirose denominadas como Astrovirus das galinhas (CkAstV), e Vírus da nefrite das galinhas tipo 1 (ANV1), ANV2 e ANV3 (Imada et al., 2000; Canelli et al., 2012).

O astrovírus tem sido associado com doença de mal absorção ou RSS em frangos de corte e conseqüentes problemas de crescimento do lote e a síndrome do pintinho branco (Canelli et al., 2012; Kang et al., 2012; Smyth et al., 2013). Nas últimas décadas uma condição de eclodibilidade, denominada “síndrome do pintinho branco”, foi observada em pintinhos de

corte em vários países como Finlândia, Noruega, Suécia, EUA e Canadá. Os pintinhos acometidos apresentam fraqueza e coloração clara e raramente sobrevivem mais de 24 horas após a eclosão (Smyth et al., 2013). Recentemente foi identificado por análise molecular que o astrovírus das galinhas é o agente etiológico responsável por essa condição. Além disso, concluíram que reprodutores naturalmente infectados com o astrovírus das galinhas durante a postura transmitem verticalmente o vírus para progênie, prejudicando o desenvolvimento do embrião e reduzindo a eclodibilidade (Smyth et al., 2013). Os sinais clínicos e lesões são pintinhos brancos que compartilham características similares da RSS, como definhamento, deficiência no desenvolvimento e fraqueza e penas anormais, incluindo lesões nos rins e fígado (Smyth, 2017). Os pintinhos acometidos apresentam penugens mais claras a brancas, ocasionalmente com penugens castanhas na cabeça e pescoço, o fígado com coloração verde a acastanhado (Smyth et al., 2009; French et al., 2016; Schlegel et al., 2016; Stayer et al., 2016; Long et al., 2017). Lesões histológicas incluem proliferação biliar, colangite, fibrose peribiliar, estase biliar, necrose hepática e aumento da quantidade de granulopose extramedular hepática (Smyth et al., 2009; Schlegel et al., 2016; Long et al., 2017).

Pesquisadores caracterizaram três isolados do astrovírus aviário em frangos de corte com a síndrome do definhamento e refugagem (Baxendale e Mebatsion, 2004). Vários fatores complexos estão provavelmente envolvidos na manifestação da doença como coinfeções com outros patógenos, tempo de infecção, carga viral e presença ou ausência de anticorpos maternos (Smyth, 2017). Um estudo detectou o astrovírus das galinhas em pintinhos de um dia de idade, sugerindo transmissão vertical (Mettifogo et al., 2014).

A reprodução experimental do astrovírus das galinhas foi realizada pela primeira vez utilizando pintinhos de um dia de idade. De acordo com os dados experimentais, esse agente pode ser a causa ou uma das causas da síndrome do definhamento e da refugagem. Foi detectada a replicação do astrovírus das galinhas na dilatação cística das criptas evidenciando pela primeira vez, experimentalmente, a associação de um vírus com a lesão RSS (Kang et al. 2018).

3.8.3. Parvovírus das galinhas

O parvovírus é frequentemente associado à doenças intestinais e acomete várias espécies de aves, como galinhas e perus (Zsak, 2015). O parvovírus das galinhas apresenta uma composição genômica diferente quando comparada a dos parvovírus de outros vertebrados. Também são distantes de outros parvovírus das aves. Sendo, mais próximo do parvovírus dos

perus, sugerindo que este vírus tenha um ancestral comum, devido a adaptação evolutiva (Day e Zsak, 2010).

O Parvovírus das galinhas é atualmente classificado dentro da subfamília Parvovirinae da família Parvoviridae (Cotmore et al., 2014). Esses vírus são pequenos (18-26nm de diâmetro), não envelopado com simetria icosaédrica. O genoma é composto de fita única de DNA com 5.257 nucleotídeos. Codifica duas proteínas, uma proteína não estrutural (NS) e uma proteína que constitui o capsídeo viral (VC) (Day e Zsak, 2010). O parvovírus das galinhas foi descrito pela primeira vez em 1984, quando partículas virais foram observadas em microscopia eletrônica nos enterócitos em aves com atraso de crescimento (Kisary et al., 1984).

A infecção pelo parvovírus das galinhas foi realizada experimentalmente em aves comerciais, nas quais foram observados sinais de RSS após sua inoculação. Esse foi o primeiro relato que descreveu a replicação deste vírus, em animais com sinais de RSS, e confirmaram que as células alvo estão localizadas no intestino, por imuno-histoquímica (Zsak et al., 2013). No Brasil, foi identificado o parvovírus das galinhas e outros vírus acometendo lotes de pintinhos com alterações entéricas como diarreia (Mettifogo et al., 2014), contudo, não foram avaliadas lesões histológicas nessas aves. Estudos realizaram coleta por suabe cloacal de animais com RSS e animais saudáveis e o genoma do parvovírus das galinhas foi detectado em todas as amostras, porém, a carga viral dos animais com RSS foi significativamente alta (Flincker et al., 2016). As aves infectadas excretam elevadas concentrações de partículas virais nas fezes, a partir de 4 dias de idade, podendo resultar em transmissão horizontal rápida de ave para ave (Zsak e Day, 2010). A transmissão vertical não está totalmente esclarecida, mas publicações sugerem a sua existência, devido a infectividade do vírus em pintinhos nos primeiros dias de vida (Tarasiuk et al., 2012).

3.8.4. Reovírus

O reovírus das aves tem sido associado com uma variedade de doenças, incluindo artrite/tenosivite viral, síndrome da malabsorção, RSS, atraso do crescimento, pericardite, miocardite, enterite e imunodepressão (Heide et al., 1981; Rosenberger et al., 1991). O reovírus das aves pertence ao gênero Orthoreovirus e família Reoviridae possuindo 10 segmentos de fita dupla de RNA. O vírion é não-envelopado, icosaédrico, com dupla camada e mede aproximadamente 80 nm de diâmetro (Jones, 2013).

Em uma pesquisa foi relatado que isolados do reovírus causaram sinais discretos de enterite, com alterações microscópicas como degeneração vacuolar e descamação de

enterócitos no intestino, principalmente no segmento do jejuno e íleo. Nenhum dos isolados causaram diminuição no ganho de peso. Por isso, não foi possível concluir que o reovírus das aves é o agente primário para a síndrome da má absorção (Songserm et al., 2003). Outros estudos experimentais com isolados virais, de aves de corte naturalmente infectadas e apresentaram sinais clínicos de síndrome de má absorção, induziram atraso no ganho de peso e lesões intestinais como infiltrado inflamatório na lâmina própria e atrofia das vilosidades intestinais do duodeno e jejuno, porém outros vírus não foram pesquisados nas aves de corte naturalmente infectadas (Vertommen et al., 1980; Van der Heide et al., 1981; Rekik et al., 1991). A infecção pelo reovírus pode potencializar a infecção por coccídeos, como *Cryptosporidium baileyi* causando diminuição significativa no ganho de peso e infecção sistêmica (Ruff & Rosenberger, 1985; Guy et al., 1988). Existem vacinas comerciais para reovírus das aves, porém podem não proteger contra a RSS devido a possível etiologia múltipla (Jones, 2013). A transmissão horizontal ocorre pela rota oral-fecal, e tem sido relatada a transmissão vertical, resultando em tenossinovite na progênie (Van der Heide e Kalbac, 1975).

3.8.5. Vírus da bronquite infecciosa

O vírus da bronquite infecciosa é um Gammacoronavirus da família Coronaviridae. É envelopado com uma forma redonda a polimórfica. As partículas do vírus têm aproximadamente 120 nm de diâmetro com projeções de superfície (Spikes) com cerca de 20 nm de comprimento, o que dá ao vírus uma aparência “como coroa” (Jackwood e Wit, 2013). O genoma do vírus é RNA linear de sentido positivo de cadeia simples, cuja glicoproteína spike (S) é proteoliticamente processada em duas cadeias peptídicas não covalentemente ligadas e designadas S1 e S2 (Chacón et al., 2014).

O alvo primário do vírus da bronquite infecciosa das aves são células epiteliais do sistema respiratório superior, predominantemente da traqueia, resultando em sinais respiratórios. Em aves de todas as idades, os sinais clínicos incluem letargia, lacrimejamento, tosse, espirros e estertores traqueais (Raj and Jones, 1997; Cavanagh e Gelb, 2008). No entanto, o vírus da bronquite infecciosa das aves também se replica nas células epiteliais ciliadas dos rins, sistema reprodutivo e intestinal produzindo nefrite grave, distúrbios reprodutivos em machos e fêmeas, queda na produção e qualidade dos ovos e baixa taxa de crescimento (Cook e Huggins, 1986; Cavanagh e Gelb, 2008). A transmissão horizontal ocorre por inalação ou ingestão de partículas virais e a transmissão vertical não foi relatada (Jackwood e De Wit, 2013).

Foram caracterizados seis isolados do vírus da bronquite infecciosa em aves com sinais respiratórios e um desses isolados era incomum, pois foi isolado de várias partes do sistema digestivo por até 21 dias após inoculação e no duodeno até 28 dias (El-Houadfi et al., 1986). Este isolado causou lesões discretas como descamação das células epiteliais do topo das vilosidades e hiperemia da camada da submucosa do reto, mas não no intestino delgado (Ambali e Jones, 1990; Ambali, 1992).

3.8.6. Família Picornaviridae

Os membros da família Picornaviridae são pequenos, não envelopados, genoma RNA de fita simples com aproximadamente 7-9Kb. Todos os genomas do picornavirus codificam um único ORF, do qual uma poliproteína longa é traduzida e clivada por proteases codificadas por vírus para produção de proteínas virais estruturais e não estruturais (Knowles et al., 2011).

A família Picornaviridae inclui mais de 30 gêneros e mais de 75 espécies (Zell et al., 2017). Pelo menos 13 gêneros de picornavirus têm sido identificados em aves. Os descritos com maior frequência como agentes de doenças em espécies avícolas são o vírus da encefalomielite aviária (AEV-1, gênero Tremovirus), vírus da hepatite A de pato (gênero Avihepatovirus), hepatite viral dos perus e vários membros potenciais do gênero Enterovirus (Day e Zsak, 2016).

A encefalomielite aviária (AEV) é causada pelo vírus que é a única espécie do gênero Tremovirus da família Picornaviridae (Hauck et al., 2017). O AEV foi relatado pela primeira vez em 1932 como distúrbio nervoso em galinhas com tremores pronunciados e rápidos da cabeça e pescoço, em alguns casos, com ataxia. Os sinais clínicos pioravam quando as galinhas ficavam agitadas, mas desapareciam durante o sono (Jones, 1932).

Em surtos de ocorrência natural, por volta de 1–2 semanas de idade, os pintinhos apresentam opacidade nos olhos, seguida por uma ataxia progressiva por falta de coordenação dos músculos e tremores evidentes da cabeça e do pescoço, cuja frequência e magnitude podem variar. Agitar ou perturbar os pintinhos pode causar o tremor, que pode continuar por períodos variáveis e se repetir em intervalos irregulares. A ataxia geralmente progride até que o filhote seja incapaz de se mover, e este estágio é seguido por inanição, prostração e, finalmente, morte (Calnek, 2008).

Em condições naturais, AEV é uma infecção entérica. A via oral é a porta de entrada para o vírus que são eliminados nas fezes por um período de aproximadamente 2 semanas em

pintinhos e até 5 dias em adultos (Westburey e Sinkovic, 1978). A cama infectada é uma fonte para o vírus ser facilmente transmitido horizontalmente ou através de fômites. A infecção se espalha rapidamente de ave para ave dentro do galpão (Calnek et al., 1960; Folkers et al., 1976). A transmissão vertical é um meio muito importante de disseminação do vírus como demonstrou um estudo em que embriões e pintinhos estavam infectados após a infecção experimental em reprodutores (Calnek et al., 1960).

A hepatite viral dos perus é uma doença caracterizada por inflamação do fígado de perus, podendo acometer o pâncreas. As lesões mais frequentes são necrose multifocal em ambos os órgãos e microscopicamente, as lesões são caracterizadas por infiltrações mononucleares focais e necrose parenquimatosa focal (Guy, 2008; Hauck et al., 2014). Em 2011, um novo picornavírus foi identificado por pirosequenciamento como o provável agente causador da Hepatite viral dos perus (Honkavuori et al., 2011). A transmissão ocorre em contato direto e indireto. A via oro-fecal parece ser a principal via de transmissão. Presume-se que o vírus da hepatite dos perus pode ser transmitido verticalmente, embora evidências experimentais de transmissão vertical ainda não existam (Hauck et al., 2014). A doença parece ser mais prevalente no inverno, provavelmente devido ao fato do frio favorecer a sobrevivência do vírus no meio ambiente (Hauck et al., 2014).

Pesquisas realizaram análises dos conteúdos e suabes intestinais de galinhas e perus e identificaram um novo picornavirus denominado *Gallivirus A*, o qual é uma espécie do gênero *Gallivirus*. Sequências parciais do genoma desse picornavírus foram detectadas em galinhas e perus (Farkas et al., 2012). O genoma completo do *Gallivirus A* foi descrito em perus na Hungria (Boros et al., 2012).

Outro estudo descreveu pela primeira vez um novo picornavirus presente na cloaca de galinhas comerciais, de Hong Kong, com idades entre 60 a 80 dias. Foram coletados suabes do ceco e analisado pela reação da transcriptase reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) seguido por sequenciamento genético e realizado a análise filogenética. A análise de oito genomas de diferentes clados revelou sete picornavírus diferentes, incluindo seis novas espécies de picornavírus dentre essas uma nova espécie denominada *Chicken Gallivirus 1* (*Gallivirus*) (Lau et al., 2014).

Um estudo recente utilizando ISH e NGS, detectou o *Gallivirus* no jejuno de pintinhos com enterite em proporção significativamente maior em comparação aos pintinhos com ausência de enterite. Este foi o primeiro estudo que encontrou o *Gallivirus* na mucosa intestinal

em quantidade significativamente maior em pintinhos com enterite comparado a pintinhos sem enterite (Oliveira, L. 2021).

3.9. Detecção dos vírus entéricos

Pesquisadores isolaram o vírus da bronquite infecciosa, reovirus e bactérias no sistema digestivo de frangos de corte que estavam com a condição RSS (Montgomery et al., 1996). O antígeno do vírus da bronquite infecciosa foi detectado no citoplasma das células do duodeno, jejuno, reto/cloaca, proventrículo e pâncreas em frangos de cortes naturalmente infectados apresentando RSS. Além disso, foram observadas alterações microscópicas em todo o intestino (Hauck et al., 2016).

São poucos os estudos que realizaram a associação da presença do agente infeccioso com as alterações histológicas e a detecção do agente etiológico *in situ*. Em um desses estudos, o RNA do astrovírus das galinhas foi detectado no epitélio das vilosidades intestinais em perus infectados (Koci et al., 2003). Em pintinhos, um estudo experimental avaliou a replicação do astrovírus *in situ* em momentos diferentes da infecção. Nas primeiras horas após a inoculação o vírus foi detectado nas células do epitélio das vilosidades, dias depois o vírus foi identificado no epitélio das criptas intestinais (Kang et al., 2018).

Alguns dos vírus associados com RSS são difíceis para cultivar no laboratório, pois a pesquisa usando técnicas convencionais é laboriosa (Todd et al., 2010). Contudo, pode-se usar um método de maior abordagem e abrangência como o sequenciamento de alto rendimento para examinar o viroma entérico (Day et al., 2010). Muitas pesquisas estão empregando com sucesso o NGS, a qual é uma ferramenta que caracteriza a microbiota de amostras de ambientes complexos. Usando a técnica de NGS, pode-se obter um amplo número de sequências permitindo a análise metagenômica comparativa entre as amostras para identificar os principais patógenos presentes no intestino e que poderiam estar relacionados a doença entérica aviária (Devaney et al., 2016; Lima et al., 2019; Kim et al., 2020). No Brasil, Lima et al. (2019) realizaram análise metagenômica utilizando somente as fezes de frangos de corte saudáveis e frangos com sinais de RSS. Mas, não foi possível associar nenhum vírus ou vírus em particular a RSS.

De forma similar no Brasil, Mettifogo et al. (2014), investigaram os agentes virais em aves de produção com sinais de doença entérica pelo método de PCR das fezes. O estudo demonstrou uma diversidade de vírus presentes em animais com sinais clínicos de RSS. Os vírus mais detectados foram Vírus da bronquite infecciosa das galinhas, Vírus da nefrite das

galinhas, Astrovírus das galinhas, Rotavírus, Reovirus e Adenovirus tipo I. Contudo, nessas aves, a avaliação microscópica intestinal não foi realizada.

Um estudo similar, determinou a ocorrência dos vírus entéricos em lotes de aves em diferentes regiões geográficas do Brasil pela técnica de PCR e RT-PCR (De La Torre et al., 2018).

A causa específica da RSS, se possui o envolvimento de um vírus ou mais ainda é incerta. Os vírus entéricos são geralmente a causa da maioria das lesões primárias ao intestino de aves jovens. A infecção viral pode fornecer a outros agentes, especialmente bactérias e fungos, um meio para replicar, aderir e penetrar nas células, causando mais danos (Saif, 2013). Além disso, fatores não infecciosos, como baixa imunidade, nutrição, ambiente e manejo inadequados, podem ter uma influência marcante no curso e na gravidade da doença (Barnes et al., 2000).

O método mais eficiente para controlar as doenças entéricas é impedir a transmissão, com esforços visando melhorar a limpeza, desinfecção e biosseguridade, além da limitação do fluxo de pessoas nas granjas (Barnes et al., 2000).

3.10. Referência:

ABAIIDULLAH, M.; PENG S.; KAMRAN, M. et al. (2019). *Current findings on gut microbiota mediated immune modulation against viral diseases in chicken*. Viruses v. 11, p.1-14.

AL-ASMAKH, M.; ZADJALI, F. (2015). *Use of germ-free animal models in microbiota-related research*. Journal of Microbiology and Biotechnology. v.25, p.1583–1588.

AL-RASHIDI, H. E. (2022). *Gut microbiota and immunity relevance in eubiosis and dysbiosis*. Saudi Journal of Biological Sciences. v.29, p.1628–1643.

AMBALI, A.G. (1992). *Recent studies on the enterotropic strain of avian infectious bronchitis virus*. Veterinary Research Communications, v.16, p.153-157.

AMBALI, A.G.; JONES, R.C. (1990). *Early pathogenesis in chicks of infection with an enterotropic strain of infectious bronchitis virus*. Avian Dis., v.34, p.809–817.

AMIT-ROMACH, E.; SKLAN, D.; UNI, Z. (2004). *Microflora ecology of the chicken intestine using 16S ribosomal DNA primers*. Poultry Science, v.83, p.1093-1098.

ARUWA, C. E.; PILLAY, C.; NYAGA, M. N. et al. (2021). *Poultry gut health – microbiome functions, environmental impacts, microbiome engineering and advancements in characterization technologies*. Journal of Animal Science and Biotechnology. v.12, p. 1-15.

APAJALAHTI J.; KETTUNEN A.; GRAHAM, H. *Characteristics of the gastrointestinal microbial communities, with special reference to the Chicken*. World's Poultry Science Journal, v, 60, p. 223-232.

BANYAI, K.; DANDAR, E.; DORSEY, K.M. et al. (2011). *The genomic constellation of a novel avian orthoreovirus strain associated with runting-stunting syndrome in broilers*. Virus Genes, v.42, p.82–89.

BARNES, G.L.; GUY, J.S.; VAILLANCOURT, J.P. (2000). *Poult enteritis complex*. Revue scientifique et technique., v.19, p.565–588.

BAVANANTHASIVAM, J.; ASTILL, J.; MATSUYAMA-KATO, A. et al. (2021). *Gut microbiota is associated with protection against Marek's disease virus infection in chickens*. Virology. v. 553, p. 122–130.

BAXENDALE, W.; MEBATSION, T. (2004). *The isolation and characterization of astroviruses from chickens*. Avian Pathology. v.33, p.364–370.

BERGELAND, M.E.; MCADARAGH, J.P.; STOTZ, I. (1977). *Rotaviral enteritis in turkey poults*. West Poultry Diseases Conference. v.26, p.129–130.

BESERRA, L.; GREGORI, F. (2014). *Description of rotavirus F in broilers from Brazilian poultry farms*. Avian Diseases. v.58, p.458–461.

BEZERRA, D.A.; DA SILVA, R.R.; KAIANO, J.H., et al. (2012). *Detection of avian group D rotavirus using the polymerase chain reaction for the VP6 gene*. Journal of Virological Methods. v.185, p.189–92.

BIASATO, I.; FERROCINO, I.; GREGO, E. et al. (2019). *Gut microbiota and mucin composition in female broiler chickens fed diets including yellow mealworm (*Tenebrio molitor*, L.)*. Animals, v.9, p.213-228.

BIDIN, M.; LOJKIC, I.; BIDIN, Z. et al. (2011). *Identification and phylogenetic diversity of parvovirus circulating in commercial chicken and turkey flocks in Croatia*. Avian Diseases. v.55, p.693–696.

- BINDARI, Y. R.; GERBER, P.F. (2022). *Centennial Review: Factors affecting the chicken gastrointestinal microbial composition and their association with gut health and productive performance*. Poultry Science, v.11, p. 1-19.
- BISHOP, R.; DAVIDSON, G.; HOLMES, I.; RUCK, B. (1973). *Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis*. Lancet. v.302, p.1281–1283.
- BOROS, A., NEMES, C., PANKOVICS, P., KAPUSINSZKY, B., DELWART, E., REUTER, G. (2012). *Identification and complete genome characterization of a novel picornavirus in turkey (Meleagris gallopavo)*. Journal of General Virology. v.93, p.2171-2182.
- BROOM, L. J.; KOGUTC, M. H. (2018). *The role of the gut microbiome in shaping the immune system of chickens*. Veterinary Immunology and Immunopathology v.204, p.44–51.
- CALNEK, B. W. Avian Encephalomyelitis. In: Diseases of Poultry, 12th ed. Y.M. Saif, ed. Blackwell Publishing, Ames, Iowa. 117–135, 2008.
- CALNEK, B. W., TAYLOR, P. J., SEVOIAN, M. (1960). *Studies on avian encephalomyelitis*. IV. Epizootiology. Avian Diseases. v.4, p.325–347.
- CANELLI E.; CORDIOLI, C.P.; BARBIERI, I. et al. (2012). *Astroviruses as causative agents of poultry enteritis: genetic characterization and longitudinal studies on field conditions*. Avian Diseases. v.56, p.173–182.
- CARTER, A. J.; ADAMS, M. R.; WOODWARD, M. J. et al. (2009). *Control strategies for Salmonella colonization of poultry: The probiotic perspective*. Journal of Food Science and Technology. v.5, p.103–115.
- CAVANAGH, D.J., GELB JR. 2008. Infectious Bronchitis. In: Diseases of Poultry, 12th ed. Y.M. Saif, ed. Blackwell Publishing, Ames, Iowa. 117–135, 2008.
- CHACÓN, J. L., ASSAYAG, M. S., JR., REVOLLEDO, L. et al. (2014). *Pathogenicity and molecular characteristics of infectious bronchitis virus (IBV) strains isolated from broilers showing diarrhoea and respiratory disease*. British Poultry Science. 55:271–283.
- CHEN, J.; TELLEZ, G.; RICHARDS, J.D. et al. (2015). *Identification of potential biomarkers for gut barrier failure in broiler chickens*. Frontiers in Veterinary Science. v.2, p.1-10.

- CLAVIJO, V.; FLÓREZ, M. J. V. (2018). *The gastrointestinal microbiome and its association with the control of pathogens in broiler chicken production: A review*. Poultry Science, v. 97, p.1006–1021.
- COTMORE, S.F., AGBANDJE-MCKENNA, M., CHIORINI, J.A., et al. (2014). *The family Parvoviridae*. Archives of virology 159, 1239-1247.
- CUI, L.; ZHANG, X.; CHENG, R. *Sex differences in growth performance are related to cecal microbiota in Chicken*. Microbial Pathogenesis. v.150, p. 1-11.
- CUI, N.; HUANG, X.; KONG, Z. et al. (2018). *Newcastle disease virus infection interferes with the formation of intestinal microflora in newly hatched specific-pathogen-free chicks*. Frontiers in Microbiology. v.9, p.1-7.
- DANZEISEN, J. L; KIM H. B.; ISAACSON R. E.(2011). *Modulations of the chicken cecal microbiome and metagenome in response to anticoccidial and growth promoter treatment*. PLoS ONE. v.6, p.1-14.
- DAVIS, J.F.; KULKARNI, A.; FLETCHER, O. (2013). *Reovirus infections in young broiler chickens*. Avian Diseases, v.57, p.321–325.
- DAY, J. M., ZSAK, L. (2016). *Molecular Characterization of Enteric Picornaviruses in Archived Turkey and Chicken Samples from the United States*. Avian Diseases, v.60, p.500–505.
- DAY, J.M.; ZSAK, L. (2010). *Determination and analysis of the full-length chicken parvovirus genome*. Virology, v.399, p.59–64.
- DE LA TORRE, D.I.; NUÑEZ L.F.; ASTOLFI-FERREIRA, C. S. et al. (2015). *Avian rotavirus enteritis—An updated review*. Vet. Q. v.35, p.142–158.
- DE WIT, J.J.; DAM, G.B.; DE LAAR, J.M. et al. (2011). *Detection and characterization of a new astrovirus in chicken and turkeys with enteric and locomotion disorders*. Avian Pathology. v.40, p.453–461.
- DEVANEY, R.; TRUDGETT, J.; TRUDGETT, A. et al. (2016). *A metagenomic comparison of endemic viruses from broiler chickens with runting stunting syndrome and from normal birds*. Avian Pathology v.45, p.616–629.

- DING, J.; DAI, R.; YANG, L. et al. (2017). *Inheritance and establishment of gut microbiota in chickens*. *Frontiers in Microbiology*. v.8, p.1-8.
- DOMANSKA-BLICHAZ, K., SEROKA, A. MINTA, Z. (2011). *One year molecular survey of astrovirus infection in turkeys in Poland*. *Archives of Virology.*, v.156, p.1065–1072.
- ECCO, R.; BROWN, C.; SUSTA, L. et al. (2011). *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*. *Veterinary Immunology Immunopathology*, v.141, p.221-229.
- EL-HOUADFI, M.; JONES, R.C.; COOK, J. K.A.; AMBALI A.G. (1986). *The isolation and Characterisation of six avian infectious bronchitis viruses isolated in morocco*. *Avian Pathology*, v. 15. p.93-105.
- ENGBERG, R. M.; HEDEMANN, M. S.; STEENFELDT, S. et al. (2004). *Influence of whole wheat and xylanase on broiler performance and microbial composition and activity in the digestive tract*. *Poultry Science*, v.83, p.925-938.
- ENGBERG, R.M.; HEDEMANN, M.S.; JENSEN, B.B. (2002). *The influence of grinding and pelleting of feed on the microbial composition and activity in the digestive tract of broiler chickens*. *British Poultry Science*, v.44, p.569–579.
- ESTES, M.K., AND A.Z. KAPIKIAN. Rotaviruses. In: *Fields Virology*, vol. 2. D.M. Knipe, P.M. Howley, D.E. Griffin, R.A. Lamb, M.A. Martin, B. Roizman, and S.E. Straus, eds. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. 1917–1974, 2007
- ESTES, M.K.; COHEN, J. (1989). *Rotavirus gene structure and function*. *Microbiology Reviews*. v.53, p.410–449.
- FALK, P. G.; HOOPER, L. V.; MIDTVEDT, T. et al. (1998). *Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: what we know and need to know from gnotobiology*. *Microbiology and molecular biology reviews*, v.62, p. 1157–1170.
- FARKAS, T., FEY, B., HARGITT, E., PARCELLS, M., LADMAN, B., MURGIA, M. AND SAIF, Y. (2012). *Molecular detection of novel picornaviruses in chickens and turkeys*. *Virus Genes*, v.44, p.262-272.

FEYE, K. M.; BAXTER, M. F. A.; TELLEZ-ISAIAS, G. et al. (2020). *Influential factors on the composition of the conventionally raised broiler gastrointestinal microbiomes*. Poultry Science. v.99, p.653–659.

FINKLER, F., LIMA, D. A., CERVA, C. et al. (2016). *Chicken parvovirus and its associations with malabsorption syndrome*. Research in Veterinary Science, 107, 178–181.

FOLKERS, C., D. JASPERS, M. E. M. STUMPEL, WITTEBRONGEL, E. A. E. (1976). *Vaccination against avian encephalomyelitis with special reference to the spray method*. Dev Biol Stand, v.33, p.364–369.

FORNEY, L. J.; ZHOU, X.; BROWN, C. J. (2004). *Molecular microbial ecology: land of the one-eyed king*. Current Opinion in Microbiology. v.7, p.210-220.

FRANCO, M.A.; GREENBERG, H.B. Rotaviruses. In: RICHMAN, D.D.; WHITLEY, R.J.; HAYDEN, F.G. (Eds). *Clinical Virology*. American Society for Microbiology, Washington, D.C., 2009, p.797–816.

FRENCH, D., P. STAYER, E. RILEY, S. VANHOOSER, P. FERRO. *Impact of astrovirus challenge on a commercial broiler breeder flock and subsequent progeny*. In: Proc. 153rd Annual Meeting of the American Veterinary Medical Association, San Antonio, TX. pp. 7. 2016.

GASKINS, H. R.; COLLIER, C. T.; ANDERSON, D. B. *Antibiotics as growth promotants: mode of action*. Animal Biotechnology. v. 13, p. 29–42.

GONG, J.; FORSTER, R. J.; HUANG, R. et al. (2007). *16S rRNA gene-based analysis of mucosa-associated bacterial community and phylogeny in the chicken gastrointestinal tracts: from crops to ceca*. FEMS Microbiological Ecology, v.59, p.147–157.

GOODWIN, M.A.; DAVIS, J.F.; PLAYER, E.C. (1993). *Reovirus associated enteritis in Georgia broiler chicks*. Avian Diseases. v.37, p.229–233.

GOUGH, R.E., COLLINS, M.S., ALEXANDER, D.J., COX W.J. (1990). *Viruses and virus-like particles detected in samples from diseased game birds in Great Britain during 1988*. Avian Pathology 19, p.331–343.

GUY, J. S. *Turkey Viral Hepatitis*. In: Diseases of Poultry, 12th ed. Y.M. Saif, ed. Blackwell Publishing, Ames, Iowa. 117–135, 2008.

- GUY, J.S. (1998). *Virus infections of the gastrointestinal tract of poultry*. Poultry Science, v.77, n.8, p.1166–1175.
- GUY, J.S., LEVY, M.G.; LEY, D.H. et al. (1988). *Interaction of reovirus and Cryptosporidium baileyi in experimentally infected chickens*. Avian Dis., v.32, p.381–390.
- HARPER, A.; VIJAYAKUMAR, V.; OUWEHAND, A. C. et al. (2021). *Viral infections, the microbiome, and probiotics*. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. v.10, p.1-21.
- HAMADY, M., LOZUPONE, C., KNIGHT, R. (2010) *Fast UniFrac: facilitating high-throughput phylogenetic analyses of microbial communities including analysis of pyrosequencing and PhyloChip data*. ISME J 4: 17–27
- HAUCK R, SENTÍES-CUÉ C. G., WANG Y.; et al. (2017). *Evolution of avian encephalomyelitis virus during embryo-adaptation*. Veterinary Microbiology, v.204, p.1–7.
- HAUCK, R., CHIN, R. P., SENTIES-CUE, G., CHARLTON, B., SHIVAPRASAD, H. L. (2014). *Retrospective study of turkey viral hepatitis in California turkey flocks, 2000–2012*. Avian Diseases. v.58, p.205–210.
- HAUCK, R.; GALLARDO, R.A.; WOOLCOCK, P.R. (2016). *A Coronavirus associated with Runting Stunting Syndrome in Broiler Chickens*. Avian Diseases., v.60, p.528–534.
- HEIDE, L, VD., LINTICKEN, D., HORZINEK, M. (1981). *Isolation of avian Reovirus as a possible etiologic agent of osteoporosis ('Brittle boné disease'; 'Femoral head necrosis') in broiler chickens*. Avian Diseases. v. 25, p.847-56.
- HEWSON, K.A.; O'ROURKE, D.; NOORMOHAMMADI, A. H. (2010). *Detection of avian nephritis virus in Australian chicken flocks*. Avian Disease. v.54, p.990–993.
- HONKAVUORI, K. S., SHIVAPRASAD, H. L., BRIESE, T., et al. (2011). *Novel picornavirus in Turkey poults with hepatitis, California, USA*. Emerging Infectious Diseases. v.17, p.480–487.
- IMADA T, YAMAGUCHI S, MASE M, TSUKAMOTO K, KUBO M et al. (2000). *Avian nephritis virus (ANV) as a new member of the family Astroviridae and construction of infectious ANV cDNA*. Journal of Virology.v.74, p.8487–8493.

- JACKWOOD M.W.; DE WIT, S. Infectious Bronchitis. In: SWAYNE D.E.; GLISSON J.R.; MCDUGALD L.R. et al. (Eds). *Diseases of Poultry*. 13 ed. UK: Wiley-Blackwell, 2013, p.139–160.
- JONES, E. E. *An encephalomyelitis in the chicken*. (1932). *Science* v.76, p.331-332.
- JONES, R.C. Reovirus infections. In: SWAYNE D.E.; GLISSON J.R.; MCDUGALD L.R. et al. (Eds). *Diseases of Poultry*. 13 ed. UK: Wiley-Blackwell, 2013, p.351–373.
- KABIR, S. M. L. (2009). *The role of probiotics in the poultry industry*. *International Journal of Molecular Sciences*. v. 10, p. 3531-3546.
- KAITHAL B.; JINDAL, N.; KUMAR, P.; MOR, S. K. (2016). *Detection and molecular characterization of enteric viruses in enteritis-affected commercial broiler chickens in India*. *Acta virologica*. v. 60, p. 361 – 371.
- KANG, K. I.; LINNEMANN, E.; ICARD A. H.; et al. (2018). *Chicken astrovirus as an aetiological agent of runting-stunting syndrome in broiler chickens*. *Journal of General Virology*. v.99, p.512–524.
- KANG, K.I.; EL-GAZZAR, M.; SELLERS, H.S. et al. (2012). *Investigation into the aetiology of runting and stunting syndrome in chickens*. *Avian Pathology*. v.41, p.41–50.
- KATHAYAT, D.; LOKESH, D.; RANJIT, S. et al. (2021). *Avian Pathogenic Escherichia coli (APEC): An overview of virulence and pathogenesis factors, zoonotic potential, and control strategies*. *Pathogens*. v.10, p.467-499.
- KERS, J. G.; VELKERS, F. C.; FISCHER, E. A. J. et al. (2018). *Host and environmental factors affecting the intestinal microbiota in chickens*. *Frontiers in Microbiology*. v.9, 1-14.
- KIM, H.R.; KWON Y.K.; JANG I.; BAE Y.C. (2020). *Viral metagenomic analysis of chickens with runting-stunting syndrome in the Republic of Korea*. *Virology Journal*., v.17, p.1-10.
- KIM, H. R.; CHAUDHARI, A. A.; LILLEHOJ, H. S. (2019). *Involvement of T cell immunity in avian coccidiosis*. *Frontiers in Immunology*, v.10, p.1-8.
- KIM, B. R.; SHIN, J.; GUEVARRA, R. B. et al. (2017). *Deciphering diversity indices for a better understanding of microbial communities*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. v. 27, p.2089–2093.

- KINDLER, E.; TROJNAR, E.; HECKEL, G.; OTTO, P.H.; JOHNE, R. (2013). *Analysis of rotavirus species diversity and Evolution including the newly determined full-length genome sequences of rotavirus F and G*. Infection, Genetics and Evolution. v.14, p.58–67.
- KISARY, J. (1985). *Indirect immunofluorescence as a diagnostic tool for parvovirus infection of broiler chickens*. Avian Pathology. v.14, p.269–273.
- KNOWLES, N.J., HOVI, T., HYYPIA, T., et al. Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, ed. by A.M.Q. King, M.J. Adams, E.B. Carstens, E.J. Lefkowitz (Elsevier, San Diego, 2011), pp. 855–880.
- KOCI, M.D.; MOSER, L.A.; KELLEY, L.A. et al. (2003). *Astrovirus induces diarrhea in the absence of inflammation and cell death*. Journal of Virology. v.77, p.11798–11808.
- KOGUT, M. H. (2013). *The gut microbiota and host innate immunity: Regulators of host metabolism and metabolic diseases in poultry*. Journal of Applied Poultry Research. v.22, p.637-646.
- KOGUT, M. H.; LEE, A.; SANTIN, E. (2020). *Microbiome and pathogen interaction with the immune system*. Poultry Science. v. 99, p.1906–1913.
- KOO, B.S.; LEE, H.R.; JEON, E.O. et al. (2015). *Genetic characterization of three novel chicken parvovirus strains based on analysis of their coding sequences*. Avian Pathology. v.44, p.28–34.
- LACONI, A.; TOLOSI, R.; MUGHINI-GRAS, L. et al. (2012) *Amoxicillin and thiamphenicol treatments may influence the co-selection of resistance genes in the chicken gut microbiota*. Scientific Reports. v.12, p.1-14.
- LAU, S.K., WOO, P.C., YIP, C.C., LI, K.S., FAN, R.Y., BAI, R., HUANG, Y., CHAN, K.H., YUEN, K.Y. (2014). *Chickens host diverse picornaviruses originated from potential interspecies transmission with recombination*. Journal of General Virology, v.95, p.1929-1944.
- LEESON, S. (2012). *Future considerations in poultry nutrition*. Poultry Science. v.91, p.1281–1285.
- LEGROTTAGLIE, R., V. RIZZI, AND P. AGRIMI. (1997). *Isolation and identification of avian rotavirus from pheasant chicks with signs of clinical enteritis*. Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases. 20:205–210.

- LEPP, D.; ZHOU, Y.; OJHA, S. et al. (2021). *Clostridium perfringens produces an adhesive pilus required for the pathogenesis of necrotic enteritis in poultry*. Journal of Bacteriology, v. 203, p.1-14.
- LEVY, M.; BLACHER, E.; ELINAV, E. (2015). *Microbiome, metabolites and host immunity*. Current Opinion in Microbiology. v.35, p.8–15.
- LI, Z.; ZHOU, J.; LIANG, H. et al. (2022). *Differences in alpha diversity of gut microbiota in neurological diseases*. Frontiers in Neuroscience. v. 16, p. 1-13.
- LI, H.; LIU, X.; CHEN, F. et al. (2018). *Avian Influenza Virus subtype H9N2 affects intestinal microbiota, barrier structure injury, and inflammatory intestinal disease in the chicken ileum*. Viruses. v.10, p.1-14.
- LI, L.; KUBASOVA, T.; RYCHLIK, I. et al. (2018). *Infectious bursal disease virus infection leads to changes in the gut associated-lymphoid tissue and the microbiota composition*. PLoS ONE. v.13, p.1-25.
- LI, Z.; WANG, W.; LIU, D. et al. (2017). *Effects of Lactobacillus acidophilus on gut microbiota composition in broilers challenged with Clostridium perfringens*. PLoS ONE. v.12, p.1-16.
- LIMA DA, C.S.P., TOCHETTO, C., VARELA, A.P.M., et al. (2019). *The intestinal virome of malabsorption syndrome-affected and unaffected broilers through shotgun metagenomics*. Virus Res. v. 261, p.9–20.
- LIU, Y.; ZHENG, Z.; YU, L. et al. (2019). *Examination of the temporal and spatial dynamics of the gut microbiome in newborn piglets reveals distinct microbial communities in six intestinal segments*. Sci. Rep. v.9, p. 1–8.
- LONG, K. E., G. M.; HASTIE, D.; OJKIĆ, M. L. B. (2017). *Economic impacts of white chick syndrome in Ontario, Canada*. Avian Dis. v.61, p.402–408.
- LU, J.; IDRIS, U.; HARMON, B. et al. (2003). *Diversity and succession of the intestinal bacterial community of the maturing broiler chicken*. Applied and Environmental Microbiology, v.69, p. 6816-6824.
- LUNA, L.G. Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology. 3rd ed. New York: McGraw-Hill. 258p. 1968.

- MACARI, M.; LUNEDO, R.; PEDROSO, A. A. (2014) Microbiota Intestinal das aves. In: *Produção de Frangos de Corte*. 2 ed. Editora FACTA, pp. 3-22.
- MANDOKI, M.; BAKONYI, T.; IVANICS, E. et al. (2006). *Phylogenetic diversity of avian nephritis virus in Hungarian chicken flocks*. *Avian Pathology*. v.35, p.224–229.
- MARCHESI, J.; RAVEL J. (2015). *The vocabulary of microbiome research: a proposal*. *Microbiome*. v. 3, p. 1-3.
- MARGUERIE, J.; LEON, O.; ALBARIC, O. et al. (2011). Birnavirus-associated proventriculitis in French broiler chickens. *Vet. Rec.* v.169, p.394–396.
- MCNULTY, M.S., GUY J.S. Avian enteroviruslike viruses. In *Diseases of poultry*, 10th Ed. (B.W. Calnek with H.J. Barnes, C.W. Beard, L.R. McDougald & Y.M. Saif eds). Iowa State University Press, Ames, 706-710, 1997.
- MCNULTY, M.S.; ALLAN, G.M.; MCCRACKEN, R.M. (1983). *Experimental infection of chickens with rotaviruses: clinical and virological findings*. *Avian Pathology*. v.12, p.45–54.
- METTIFOGO E.; NUÑEZ, L.F.N.; CHACÓN, J.L. et al. (2014). *Emergence of enteric viruses in production chickens is a concern for avian health*. *Scient. World J.*, v.2014, ID.450423.
- MONTGOMERY, R.D.; BOYLE, C.R.; MASLIN, W.R.; MAGEE, D.L. (1997). *Attempts to reproduce a runting/stunting-type syndrome using infectious agents isolated from affected Mississippi broilers*. *Avian Diseases*. v.41, p.80–92.
- MONTORO-DASI, L.; VILLAGRA, A.; TORO, M. et al. (2021). *Assessment of microbiota modulation in poultry to combat infectious diseases*. *Animals*, v.11, p. 1-9.
- MOON, H.W. (1978). *Mechanisms in the pathogenesis of diarrhea*. *J Am Vet Med Assoc*. 172:443–448.
- MORGAN, X. C.; HUTTENHOWER, C. (2012). *Chapter 12: human microbiome analysis*. *PLOS Computational Biology*. v.8, p.1-14.
- NOIVA, R.; GUY, J.S.; HAUCK, R.; SHIVAPRASAD, H.L. (2015). *Runting stunting syndrome associated with transmissible viral proventriculitis in broiler chickens*. *Avian Diseases*. v.59, p.384–387.
- OAKLEY, B. B.; LILLEHOJ, H. S.; KOGUT, M. H. et al. (2014). *The chicken gastrointestinal microbiome*. *FEMS Microbiology Letters*. v.360, p.100–112.

- OLIVEIRA, L. B.; STANTON, J. B.; ZHANG, J. et al. (2021). *Runting and stunting syndrome in broiler chickens: histopathology and association with a novel picornavirus*. *Veterinary Pathology*. v. 58, p.123-135.
- OH, J. K.; PAJARILLO, E. A. B.; CHAE, J. P. et al. (2017). *Effects of Bacillus subtilis CSL2 on the composition and functional diversity of the faecal microbiota of broiler chickens challenged with Salmonella Gallinarum*. *Journal of Animal Science and Biotechnology*. v.8, p. 1-9.
- OTTO, P.; LIEBLER-TENORIO, E.M.; ELSCHNER, M. et al. (2006). *Detection of rotaviruses and intestinal lesions in broiler chicks from flocks with runting and stunting syndrome (RSS)*. *Avian Diseases*. v.50, p.411– 418.
- OTTO, P.H.; AHMED, M.U.; HOTZEL, H. et al. (2012). *Detection of avian rotaviruses of groups A, D, F and G in diseased chickens and turkeys from Europe and Bangladesh*. *Veterinary Microbiology*. v.156, p.8–15.
- PALADE, E.A.; KISARY, J.; BENYEDA, Z. et al. (2011). *Naturally occurring parvoviral infection in Hungarian broiler flocks*. *Avian Pathology*. v.40, p.191–197.
- PAN, D.; YU, Z. (2014). *Intestinal microbiome of poultry and its interaction with host and diet*. *Gut Microbes*, v.5, p.108–119.
- PANDIT, R. J.; HINSU, A. T.; PATEL, N. V. et al. (2018). *Microbial diversity and Community composition of caecal microbiota in commercial and indigenous Indian chickens determined using 16s rDNA amplicon sequencing*. *Microbiome*. v.6, p.1-13.
- PANTIN-JACKWOOD, M., DAY, J.M.; JACKWOOD, M.W.; SPACKMAN, E. (2008). *Enteric viruses detected by molecular methods in commercial chicken and turkey flocks in the United States between 2005 and 2006*. *Avian Diseases*.v.52, p.235–244.
- PANTIN-JACKWOOD, M.J.; SPACKMAN, E.; DAY, J.M.; RIVES, D. (2007). *Periodic monitoring of commercial turkeys for enteric viruses indicates continuous presence of astrovirus and rotavirus on the farms*. *Avian Diseases*. v.51, p.674–680.
- PANTIN-JACKWOOD, M.J.; SPACKMAN, E.; WOOLCOCK, P.R. (2006). *Molecular characterization and typing of chicken and turkey astroviruses circulating in the United States: implications for diagnostics*. *Avian Disease*. v.50, p.397–404.

- PASCUCCI, S., LAVAZZA, A. (1994). A survey of enteric viruses in commercial avian species: experimental studies of transmissible enteritis of guinea fowl. In: *New and Evolving Virus Diseases of Poultry*. M.S. McNulty and J.B. McFerran, eds. Commission of the European Communities, Brussels. 225–241.
- PAUL, S. S.; CHATTERJEE, R. N., RAJU, M. V. L. N. et al. (2021). *Gut microbial composition differs extensively among indian native chicken breeds originated in different geographical locations and a commercial broiler line, but breed-specific, as well as across-breed core microbiomes, are found*. *Microorganisms*. v.9, p. 1-21.
- PERUMBAKKAM, S.; HUNT, H. D.; CHENG, H. H. et al. (2014). *Marek's disease virus influences the core gut microbiome of the chicken during the early and late phases of viral replication*. *FEMS Microbiology Ecology*. v. 90, p. 300–312.
- PLATA, G.; BAXTER N. T.; SUSANTI, D. et al. (2022). *Growth promotion and antibiotic induced metabolic shifts in the chicken gut microbiome*. *Communications Biology*. v.5, p.1-14.
- QI, Z.; SHI, S.; TU, J. et al. (2019). *Comparative metagenomic sequencing analysis of cecum microbial diversity and function in broilers and layers*. *Biotech*. v.9, p. 1-10.
- QU, A.; BRULC, J. M.; WILSON, M. K. et al. (2008). *Comparative metagenomics reveals host specific metavirulomes and horizontal gene transfer elements in the chicken cecum microbiome*. *PLoS ONE*. v.3, p.1-19.
- RAJ, G.D., JONES, R.C. (1997). *Infectious bronchitis virus: Immunopathogenesis of infection in the chicken*. *Avian Pathology*. 26:677–706.
- REBEL, J.M.; BALK, F.R.; POST, J. et al. (2006). *Malabsorption syndrome in broilers*. *Worlds Poultry Science Journal*. v.62, p.17–29.
- REKIK, M.R., SILIM, A., BERNIER, G. (1991). *Serological and pathogenic characterisation of avian reoviruses isolated in Quebec*. *Avian Pathol*. 20:607–617.
- REYNOLDS, D.L., THEIL, K.W., SAIF, Y.M. (1987). *Demonstration of rotavirus and rotavirus-like virus from the intestinal contents of diarrheic pheasant chicks*. *Avian Diseases*. 31, 376–379.
- REYNOLDS, D.L.; SCHULTZ-CHERRY, S. *Astroviruses*. In: SAIF, Y.M.; FADLY, A.M. GLISSON, J.R. (Eds). *Diseases of Poultry*, 12 ed. Iowa State Press, Ames, Iowa, 2008, p.351-355.

- RICHARDS-RIOS, P.; FOTHERGILL, J.; BERNARDEAU, M. et al. (2020). *Development of the ileal microbiota in three broiler breeds*. *Frontiers in Veterinary Science*. v.7, p.1-18.
- RIOS, R.L.; MARIN, S.Y.; GOMES, A.M. et al. (2012). *The occurrence of Orthoreovirus, Rotavirus and chicken anemia virus in chickens of the poultry industry in Minas Gerais, Brazil*. *Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia*. v.64, n.6, p.1613-1620.
- ROBINSON, C. M.; PFEIFFER, J. K. (2014). *Viruses and the Microbiota*. *Annual Review of Virology*. v. 1, p.55–69.
- ROSENBERGER, J.K., OLSON, N.O. Reovirus infections. In BW Calnek (Ed.), *Disease of Poultry*. Ames: Iowa State University Press. 1991, 9th edn, pp. 639-47.
- ROUSSAN, D.A.; SHAHEEN, I.A.; KHAWALDEH, G.Y. et al. (2012). *Simultaneous detection of astrovirus, rotavirus, reovirus and adenovirus type 1 in broiler chicken flocks*. *Polish Journal of Veterinary Sciences*. v.15, p.337–344.
- RYCHLICK, I. (2020). *Composition and Function of Chicken Gut Microbiota*. *Animals*. v.10, p. 1-21.
- RUFF, M.D.; ROSENBERGER, J.K. (1985). *Concurrent infections with reoviruses and coccidia in broilers*. *Avian Dis.*, v.29, p.465–478.
- SAIF, Y.M. Viral enteric infections. In: SWAYNE D.E.; GLISSON J.R.; MCDUGALD L.R. et al. (Eds). *Diseases of Poultry*. 13 ed. UK: Wiley-Blackwell, 2013, p.375–376.
- SCHLEGEL, B.; BRASH, M.; OJKIC, D. (2016). White chick syndrome in Alberta. In: *Proc. 65th Western Poultry Disease Conference*, Vancouver, British Columbia, Canada. pp. 231–233.
- SCHOKKER, D.; VENINGA, G.; VASTENHOUW, S. A. et al. (2015). *Early life microbial colonization of the gut and intestinal development differ between genetically divergent broiler lines*. *BMC Genomics*. v.16, p.1-13.
- SCHULTZ-CHERRY, S.; KAPCZYNSKI, D.R.; SIMMONS, V.M et al. (2000). *Identifying agent(s) associated with poult enteritis mortality syndrome: importance of the thymus*. *Avian Dis*. 44:256–265.
- SELLERS, H.; LINNEMAN, E.; ICARD, A.H.; MUNDT, E. (2010). *A purified recombinant baculovirus expressed capsid protein of a new astrovirus provides partial protection to runting-stunting syndrome in chickens*. *Vaccine*, n.28, p.1253–1263.

- SERGEANT, M. J.; CONSTANTINIDOU, C.; COGAN, T. (2012). *High-Throughput sequencing of 16s rRNA gene amplicons: effects of extraction procedure, primer length and annealing temperature*. PLoS ONE. v.7, p. 1-10.
- SHANG, Y.; KUMAR, S.; OAKLEY, B. et al. (2018). *Chicken gut microbiota: importance and detection technology*. Frontiers in Veterinary Science. v.5, p.1-11.
- SHAPIRO F.; NIR, I.; HELLER, D. (1998). *Stunting syndrome in broilers: effect of stunting syndrome inoculum obtained from stunting syndrome affected broilers, on broilers, leghorns and Turkey poults*. Poultry Science, v.77, n.2, p.230–236.
- SMYTH, V., J. TRUDGETT, M. WYLIE, H. et al. (2013). *Chicken astrovirus detected in hatchability problems associated with ‘white chicks.’* Vet. Rec. v.173, p.403–404.
- SMYTH, V.J. (2017). *A review of the strain diversity and pathogenesis of chicken astrovirus*. Viruses, v.29, p.1-10.
- SMYTH, V.J.; JEWHRST, H.L.; ADAIR, B.M.; TODD, D. (2009). *Detection of chicken astrovirus by reverse transcriptase-polymerase chain reaction*. Avian Pathology. v.38, p.293–299.
- SMYTH, V.J.; JEWHRST, H.L.; WILKINSON, D.S. et al. (2010). *Development and evaluation of real-time TaqMan(R) RT-PCR assays for the detection of avian nephritis virus and chicken astrovirus in chickens*. Avian Pathol., v.39, p.467–474.
- SONGSERM, T., D. VAN ROOZELAAR, A. KANT, et al. (2003). *Enteropathogenicity of Dutch and German avian reoviruses in SPF white leghorn chickens and broilers*. Vet Res. v.34, p.285–295.
- SPECIAN, R.D.; OLIVER, M.G. (1991). *Functional biology of intestinal goblet cells*. American Journal of Physiology. v.260, p.183–193.
- STANLEY D.; GEIER M. S., DENMAN, S. et al. (2013). *Identification of chicken intestinal microbiota correlated with the efficiency of energy extraction from feed*. Veterinary Microbiology, v.164, p.85-92.
- STANLEY, D., HUGHES, R. J.; MOORE, R. J. (2014). *Microbiota of the Chicken gastrointestinal tract: Influence on health, productivity and disease*. Applied Microbiology and Biotechnology. v.98, p.4301–4310.

- STAYER, P. A., E. G. RILEY, J. D. FRENCH, et al. Incursion and recursion of “white chicks” in U.S. commercial broiler production. In: Proc. 153rd Annual Meeting of the American Veterinary Medical Association, San Antonio, TX. pp. 8. 2016.
- TAKASE, K.; NONAKA, F.; SAKAGUCHI, M.; YAMADA, S. (1986). *Cytopathic avian rotavirus isolated from duck faeces in chicken kidney cell cultures*. Avian Pathology. v.15, p.719–730.
- TALAMINI, D. J., MARTINS, F. M., FILHO, J. I. S. Conjuntura Econômica da Avicultura Brasileira em 2018. Estudos da Embrapa. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/190390/1/final9033.pdf>. Acessado em 27/03/2020.
- TANNER, M.; GANCBERG, D.; DILEO, A. et al. (2000). *Chromogenic in situ hybridization: a practical alternative for fluorescence in situ hybridization to detect HER-2/neu oncogene amplification in archival breast cancer samples*. The American Journal of Pathology. Philadelphia, v. 157, n. 5, p. 1467-1472.
- TARASIUK, K.; WOZNIAKOWSKI, G.; SAMOREK-SALAMONOWICZ, E. (2012). *Occurrence of chicken parvovirus infection in Poland*. Open Virology Journal. v.6, p.7–11.
- TELLEZ, G.; LATORRE, J. D.; KUTTAPPAN, V. A. et al. (2014). *Utilization of rye as energy source affects bacterial translocation, intestinal viscosity, microbiota composition, and bone mineralization in broiler chickens*. Frontiers in Genetics, v.5, p.1-8.
- TIMBERMONT, L.; HAESEBROUCK, F.; DUCATELLE, R. et al. (2011). *Necrotic enteritis in broilers: an updated review on the pathogenesis*. Avian Pathology, v.40, 341-347.
- TODD, D.; SMYTH, V.J.; BALL, N.W. et al. (2009). *Identification of chicken enterovirus-like viruses, duck hepatitis virus type 2 and duck hepatitis virus type 3 as astroviruses*. Avian Pathology. v.38, p.21–30.
- TODD, D.; TRUDGETT, J.; MCNEILLY, F.; et al. (2010). *Development and application of an RT-PCR test for detecting avian nephritis virus*. Avian Pathology, 39, 207 – 213.
- VAN DER HEIDE, L.; LUTTICKEN, D.; HORZINEK, M. (1981). *“Isolation of avian reovirus as a possible etiologic agent of osteoporosis (“brittle bone disease”; “femoral head necrosis”) in broiler chickens,”* Avian Diseases. v. 25, p. 847–856.

- VAN DER HEIDE, L.; KALBAC, M. (1975). *Infectious tenosynovitis (viral arthritis): characterization of a Connecticut viral isolant as a reovirus and evidence of viral egg transmission by reovirus-infected broiler breeders*. Avian Diseases. v.19, p.683–688.
- VERTOMMEN, M., VAN ECK, J.H.H., KOUWENHOVEN, B., VAN NOL K. (1980). *Infectious stunting and leg weakness in broilers. I. Pathology and biochemical changes in blood plasma*. Avian Pathology. v.9, p.133–142.
- WANG, Y.; QIAN, P. Y. (2009). *Conservative fragments in bacterial 16s rRNA genes and primer design for 16s ribosomal dna amplicons in metagenomic studies*. PLoS ONE. v.4, p. 1-9.
- WEI, S.; MORRISON M.; YU, Z. 2013. *Bacterial census of poultry intestinal microbiome*. Poultry Science. v.92, p.671–683.
- WESTBURY, H. A., SINKOVIC, B. (1978). *The pathogenesis of infectious avian encephalomyelitis. IV. The effect of maternal antibody on the development of the disease*. Australian Veterinary Journal. v54, p.81–85.
- WILLING, B. P.; VAN KESSEL, A. G. (2007) *Enterocyte proliferation and apoptosis in the caudal small intestine is influenced by the composition of colonizing comensal bacteria in the neonatal gnotobiotic pig*. Journal of Animal Science. v. 85, p.3256-66.
- WISE, M.G.; SIRAGUSA, G.R. (2006). *Quantitative analysis of the intestinal bacterial community in one- to three-week-old commercially reared broiler chickens fed conventional orantibiotic-free vegetable based diets*. Journal of Applied Microbiology, v.102, p.1138-1149.
- WOLF, S.; REETZ, J.; OTTO, P. (2011). *Genetic characterization of a novel calicivirus from a chicken*. Archives of Virology. v.156, p.1143–1150.
- XI, Y.; SHULING, N.; KUNYUANA, T. et al. (2019). *Characteristics of the intestinal flora of specific pathogen free chickens with age*. Microbial Pathogenesis. v.132, p.325–334.
- XIAO, S. S.; JIAN-DUI M.; LIANG M. J. et al. (2021). *Microbial diversity and community variation in the intestines of layer chickens*. Animals. v.11, p.840- 857.
- YANG, J.; TONG, C.; XIAO, D. et al. (2022) *Metagenomic insights into chicken gut antibiotic resistomes and microbiomes*. Microbiology Spectrum. v.10, p.1-15.

- YEOMAN, C. J.; CHIA, N.; JERALDO, P. et al. (2012) *The microbiome of the chicken gastrointestinal tract*. *Animal Health Research Reviews*. v.13, p.89–99.
- YIN, H. C.; LIU, Z. D.; ZHANG, W. W. (2022). *Chicken intestinal microbiota modulation of resistance to nephropathogenic infectious bronchitis virus infection through IFN-I*. *Microbiome*. v.10, p.1-17.
- YITBAREK, A.; WEESE, J. S.; ALKI, T. N. et al. (2017) *Influenza A virus subtype H9N2 infection disrupts the composition of intestinal microbiota of chickens*. *FEMS Microbiology Ecology*. v. 94, p. 1-10.
- ZEKARIAS, B.; STOCKHOFE-ZURWIEDEN, N.; POST, J. et al. (2005). *The pathogenesis of and susceptibility to malabsorption syndrome in broilers is associated with heterophil influx into the intestinal mucosa and epithelial apoptosis*. *Avian Pathology*. v.34, p.402–407.
- ZELL, R., DELWART, E., GORBALENYA, A. E., et al. (2017). *ICTV Virus Taxonomy Profile: Picornaviridae*. *Journal of General Virology*. v.98, p.2421–2422.
- ZHENG, D.; LIWINSKI, T.; ELINAV, E. (2020). *Interaction between microbiota and immunity in health and disease*. *Cell Research*. v.30, p. 492–506.
- ZHOU, Q.; LAN, F.; LI, X. et al. (2021). *The spatial and temporal characterization of gut microbiota in broilers*. *Frontiers in Veterinary Science*. v.8, p. 1-11.
- ZHU, X.Y. et al. *16S rRNA-based analysis of microbiota from the cecum of broiler chickens*. *Applied and Environmental Microbiology*, v.68, p.124-137, 2002.
- ZSAK, L.; CHA, R. M.; LI F.; DAY, J. M. (2015). *Host Specificity and Phylogenetic Relationships of Chicken and Turkey Parvoviruses*. *Avian Diseases*. v. 59, p.157–161.
- ZSAK, L.; CHA, R.M.; DAY, J.M. (2013). *Chicken parvovirus-induced runting-stunting syndrome in young broilers*. *Avian Diseases*. v.57, p.123–127.
- ZSAK, L.; DAY, J.M. (2010). The pathogenicity of parvovirus in chickens. In: *Proceedings of the American Association of Avian Pathologists Annual Meeting, Atlanta, GA, abstract 9293*.

CAPÍTULO I

Alterações da microbiota intestinal de frangos de corte com a síndrome do definhamento e refugagem

4. INTRODUÇÃO

As doenças entéricas são causas relevantes de perdas econômicas na indústria avícola em todo o mundo. São caracterizadas por diarreia, atraso no crescimento e ganho de peso, além de mortalidade acima do normal (Saif, 2003; Kaithal et al., 2016). As doenças entéricas virais das aves têm se mostrado muito difíceis de reproduzir experimentalmente com inóculos virais definidos, portanto, os agentes ainda não foram completamente definidos (Rebel et al., 2006; Day e Zsak, 2013).

No final dos anos 70, foram documentados dois relatos (Olsen, 1977, Kouwenhoven et al., 1978) de uma doença em frangos jovens caracterizada notavelmente por pesos corporais reduzidos. Desde então, numerosas publicações relatam essa doença que implica na redução do ganho de peso em pintinhos (Montgomery et al., 1997; Hauck et al., 2016). Esta condição recebeu diferentes denominações como enterite coronaviral, síndrome de má digestão, síndrome de má absorção, síndrome do definhamento e refugagem (RSS, *Runting and Stunting Syndrome*) e enterite viral (Kaithal et al., 2016). Os principais sinais clínicos são atraso no crescimento e apatia, seguido de diminuição da ingestão de alimentos, diarreia, desenvolvimento anormal das penas e mortalidade (de Oliveira et al., 2021). As lesões macroscópicas são caracterizadas por serosa do intestino delgado mais esbranquiçada que o normal, lúmen distendido por conteúdo aquoso, mucoide ou espumoso (Hauck et al., 2016). Na microscopia, há dilatação das criptas com achatamento do epitélio (enterite cística) e atrofia e fusão das vilosidades do intestino delgado. A lâmina própria contém infiltrados de heterófilos, macrófagos e linfócitos (Goodwich et al., 1993, Kang et al., 2012, de Oliveira et al., 2021).

A definição do agente viral ainda não foi completamente esclarecida, mas um número considerável de vírus tem sido associado com a RSS causando os sinais clínicos da doença, tais como: astrovírus das galinhas (Kang et al., 2018), coronavírus (Hauck et al., 2016), parvovírus das galinhas (Zsak et al., 2013), reovírus aviário (Goodwich et al., 1993), rotavírus aviário (Otto et al., 2006; Pantin-Jackwood et al., 2008), *Gallivirus* (de Oliveira et al., 2021), calicivírus (Wolf et al., 2011; Devaney et al., 2016), vírus da nefrite aviária (ANV) (Mandoki et al., 2006;

Pantin-Jackwood et al., 2006; Pantin-Jackwood et al., 2008), vírus pertencentes às famílias *Picornaviridae*, *Siphoviridae* e *Myoviridae* (Devaney et al., 2016). Os vírus entéricos induzem danos à mucosa, que pode fornecer uma porta de entrada para outros patógenos potenciais, como *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. Tais lesões também podem promover a aderência gastrointestinal de patógenos como resultado da perda dos mecanismos de defesa normais como, glicocálice, mucina e microvilosidades (Guy, 1998).

O sistema intestinal das aves abriga uma complexa e dinâmica comunidade microbiana consistindo principalmente de bactérias (Wei et al., 2013). A integridade do sistema gastrointestinal e da comunidade microbiana intestinal tem um papel vital na absorção de nutrientes, desenvolvimento de imunidade e resistência a doenças. Alterações na microbiota intestinal pode ter efeitos adversos na eficiência alimentar, produtividade e saúde das aves (Kohl, 2012; Shang et al, 2018). A microbiota intestinal desempenha um papel fundamental para regular e induzir respostas do hospedeiro contra vários patógenos, incluindo vírus, bactérias e fungos (Abaidullah et al., 2016). Nos últimos anos, a interação vírus-microbiota intestinal vem sendo investigada. Esses estudos sobre as interações transreinos sugerem um papel importante da microbiota na replicação, desenvolvimento e progressão do vírus (Pfeiffer e Virgin, 2016).

O sistema gastrointestinal é um ambiente altamente reativo e um dos principais locais de exposição a patógenos, portanto, qualquer infecção pode ameaçar o equilíbrio homeostático entre hospedeiro e microbiota intestinal (Perumbakkam et al., 2014). A inflamação intestinal pode levar a uma composição alterada da microbiota intestinal, conhecida como disbiose, que está associada a alterações funcionais no transcriptoma microbiano, proteoma ou metaboloma (Pickard et al., 2017). Atualmente, a disbiose tem sido amplamente definida como qualquer alteração na composição das comunidades comensais residentes em relação àquelas encontradas em indivíduos saudáveis, além disso, há um aumento de espécies bacterianas potencialmente patogênicas e uma diminuição das benéficas ou alteração na diversidade alfa (riqueza e distribuição das espécies da microbiota) (Harper et al., 2021). Evidências crescentes mostraram que a perturbação da comunidade microbiana intestinal pode alimentar a proliferação de patobiontes que podem exacerbar ainda mais a inflamação intestinal (Pickard et al., 2017). Infecções intestinais em aves causadas por vírus é um dos principais fatores que causam disbiose e distúrbios da homeostasia imune, podendo resultar em infecções secundárias e pode envolver outros órgãos (Wickramasuriya et al., 2022).

O efeito da infecção viral na composição da microbiota intestinal de aves de produção ainda é pouco conhecido, embora todas as evidências existentes de outros vertebrados sugiram que patógenos virais podem influenciar a composição da microbiota intestinal para estabelecer infecções (Yitbarek et al., 2018). Estudos têm focado na investigação etiológica e patogênica da RSS, mas até o momento nenhum avaliou as alterações da composição da microbiota do intestino delgado. O objetivo desse trabalho foi investigar as características da composição da comunidade bacteriana do íleo de pintinhos de corte naturalmente acometidos pela RSS em comparação a pintinhos sem RSS, usando tecnologia de sequenciamento de nova geração (NGS).

4.1. Material e métodos:

4.1.1. Amostras

Foram utilizadas amostras do conteúdo e da mucosa do íleo de pintinhos de duas propriedades distintas, dois lotes diferentes totalizando 32 amostras, coletados durante o ano de 2017. As propriedades estão localizadas em dois municípios distintos de Minas Gerais (Pará de Minas e Atibaia). Na propriedade 01 os pintinhos estavam com 7 dias de idade e na propriedade 02 estavam com 6 dias de idade. Essas propriedades foram selecionadas devido ao histórico prévio de RSS e/ou histórico de perdas econômicas resultantes de lotes com atraso de crescimento e ganho de peso ineficiente na primeira semana de idade. O galpão de criação das duas propriedades era do tipo *dark house*. Os pintinhos das duas propriedades receberam antibiótico *in ovo* no incubatório, a ração pré-inicial (1 a 7 dias) era farelada, sendo a base da ração constituída de milho, farelo de soja, farinha de carne e osso e óleo de soja, sendo a energia metabolizável entre 2.990-2.992 kcal. Próbióticos não foram utilizados. O bebedouro era do tipo automático com boa regulação e fornecimento de água *ad libitum*. Os pintinhos selecionados apresentavam sinais clínicos característicos de RSS, como apatia, diarreia com atraso de crescimento e desenvolvimento anormal das penas. No Setor de Patologia Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), cada pintinho foi pesado individualmente na mesma balança digital e eutanasiado por deslocamento cervical de acordo com as orientações sobre eutanásia Resolução 1000/2012 do Conselho Federal de Medicina Veterinária. Os procedimentos deste estudo foram realizados com aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (Protocolo 62/2017). Os critérios para selecionar os pintinhos de corte incluíram lesões histológicas acentuadas de RSS. Dessa forma, foram considerados o percentual de criptas necróticas, criptas dilatadas e o infiltrado inflamatório intestinal. Em 08 amostras do intestino

delgado de pintinhos da propriedade 01 foi realizada a identificação viral por NGS, em um estudo prévio (Tabela 1) (Oliveira et al., 2021). Neste estudo, foram identificadas lesões de enterite viral no intestino delgado, sendo que o jejuno foi o segmento com lesões mais acentuadas. Alterações histológicas como fusão e atrofia de vilosidades nessa porção do intestino poderiam impossibilitar uma análise eficaz da microbiota intestinal, devido as perturbações inflamatórias e morfológicas, portanto, a região do íleo foi escolhida para avaliação de possíveis alterações da microbiota intestinal. A seleção do íleo dos pintinhos de corte do mesmo lote que não apresentaram a RSS e sem lesões histológicas nos intestinos e em outros órgãos também foi realizada para comparação. Dos 32 pintinhos selecionados, 21 pintinhos eram da propriedade 01, sendo 11 amostras do íleo de pintinhos com RSS e 10 amostras do íleo de pintinhos saudáveis, todos do mesmo lote. Já na propriedade 02 foram selecionadas 7 amostras de íleo de pintinhos com RSS e 4 amostras do íleo de pintinhos saudáveis, todos do mesmo lote.

Tabela 1. Vírus identificados por NGS em 08 amostras de jejuno de pintinhos com RSS da propriedade 01. RNA foi obtido de amostras de jejuno fixados e incluídos em parafina (Oliveira et al., 2021).

Amostras da propriedade 01 de pintinhos com RSS submetidas ao NGS	Vírus identificados por NGS
Pintinho 78	<ul style="list-style-type: none"> • Avastrovirus
Pintinho 83	<ul style="list-style-type: none"> • Gallivirus • Avastrovirus
Pintinho 84	<ul style="list-style-type: none"> • Gallivirus • Rotavirus F • Avastrovirus
Pintinho 86	<ul style="list-style-type: none"> • Avastrovirus • Vírus da nefrite aviária 1 e 2
Pintinho 88	<ul style="list-style-type: none"> • Gallivirus • Avastrovirus • Vírus da nefrite aviária 1 e 2
Pintinho 228	<ul style="list-style-type: none"> • Avastrovirus • Gallivirus • Rotavirus F
Pintinho 229	<ul style="list-style-type: none"> • Avastrovirus • Gallivirus • Rotavirus D
Pintinho 235	<ul style="list-style-type: none"> • Avastrovirus • Gallivirus • Vírus da nefrite aviária 1 e 2

Extração de DNA

As amostras de íleo estavam armazenadas em ultrafreezer -80°C até seu processamento. Inicialmente foi realizado pré tratamento para lise da parede celular de bactérias gram positivas, o qual consistia em um mix com os seguintes reagentes: DTT (10% de DTT em PBS pH 7.2); solução de TrisHCl 200mM; solução de EDTA 20mM; Triton X100; solução de Lisozima (100mg/mL em PBS, pH7.2). Além disso, foram utilizadas 0,3 g por amostra de beads de zircônio 0,1mm. A homogeneização da amostra foi realizada no TissueLyser LT durante 10 minutos em velocidade máxima. Em seguida, foi utilizado um kit comercial (DNeasy Blood & Tissue Kit, Qiagen Inc., Toronto, Ontário), seguindo as recomendações do fabricante. O DNA foi quantificado e a purificação foi determinada pelo espectrofotômetro NanoDrop® 2000/2000c (ThermoFisher Scientific, USA).

4.1.2. Sequenciamento genômico

Para a reação em cadeia da polimerase (PCR) inicial foram utilizados primers conforme descrito no protocolo da Illumina para *MiSeq*. Combinações de primers para a PCR do 16S

Amplicon	Forward	Primer	=
5'	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG		e
16S	Reverse	Primer	=
5'	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC		

visando as regiões hipervariáveis V3-V4 do gene 16s rRNA. Para a realização da PCR para a amplificação do 16S rRNA foi utilizado Platinum™ Taq DNA *Polymerase High Fidelity* (Invitrogen). Os ciclos utilizados foram 1 ciclo de desnaturação inicial a 94°C por 3 min, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 15 segundos, anelamento a 58°C por 30 segundos e extensão a 68°C durante 1 min, extensão final a 68°C por 7 minutos.

Posteriormente, os amplicons de PCR foram purificados usando esferas Agencourt AMPure (Beckman Coulter, Indianapolis, IN). Os amplicons purificados foram amplificados com pares únicos de *i5 forward index i7 reverse index* fornecidos pelo kit Nextera XT Index (Illumina, San Diego, CA, EUA). Cada conjunto de PCRs incluiu extração e PCR em branco. Ambos [i5] e [i7] são as sequências de 10 pb de códigos de barras únicos, que permitiram que as bibliotecas agrupadas fossem sequenciadas simultaneamente, conhecido como

multiplexação de amostra. Os amplicons com índice em código de barras foram purificados usando esferas Agencourt AMPure (Beckman Coulter, Indianapolis, IN) e quantificados utilizando Fluorômetro Qubit®2.0 e Qubit™ dsDNA HS and BR Assay Kits (Thermo Fisher Scientific, EUA). Quantidades iguais de cada amplicon purificado contendo código de barras foram reunidas para construir bibliotecas. As bibliotecas foram sequenciadas na plataforma Illumina MiSeq usando o protocolo paired-end 2 × 300 bp MiSeq Reagent Kit v3 (600-cycle) (Illumina, San Diego, CA, EUA).

4.1.3 Análise de bioinformática e estatística

Os dados brutos da sequência foram analisados usando o *pipeline* QIIME 2 (<https://qiime2.org/>) (versão 2020.6) e o pacote *phyloseq* R (<https://joey711.github.io/phyloseq/>)³⁷. Os dados brutos da sequência foram removidos usando DADA2 no pacote QIIME 238. Os arquivos FASTQ de extremidade emparelhada foram processados por filtragem de qualidade (average score of <20) baseada em pontuação de qualidade *Phred*, fusão das extremidades emparelhadas, remoção de quimera, remoção de singleton e construção de uma tabela de recursos que consiste em variantes de sequência amplicon (ASV). Usando o método DADA2 denoise-single, regiões de baixa qualidade das sequências foram removidas e definida a opção de sequência truncada para 260. Todos os ASV foram alinhados pelo MAFFT por meio do alinhamento q2 e a análise filogenética foi realizada usando Fasttree2. Um classificador de taxonomia de aprendizado de máquina *scikitlearn naïve Bayes* contra as sequências de referência SILVA 138 SSU (SILVA rRNA database project, <https://www.arb-silva.de/> 16S rRNA RefSeq Versão 15.1 foi treinado com o plugin *q2-feature-classifier* usando as regiões V3V4 de sequências 16S rRNA. A taxonomia foi atribuída a cada ASV usando o comando '*classify-sklearn*' no *q2-feature-classifier*. Usando a árvore filogenética enraizada construída, foram realizadas análises de diversidade usando o plugin de diversidade dentro do pacote QIIME 2. A diversidade alfa e diversidade beta foram calculadas entre os grupos usando o teste Mann-Whitney e a análise de variância multivariada permutacional (PERMANOVA), respectivamente. DESeq2 foi usado para identificar filotipos diferencialmente abundantes com o valor P ajustado (padj) $\geq 0,05$ para testes múltiplos usando o método Benjamini-Hochberg.

4.2. Resultados

4.2.1. Dados do sequenciamento

Um total de 1.432.294 *reads* brutas foram obtidas após o sequenciamento. Após montagem e filtragem de qualidade, um total de 879.602 leituras passaram pelos filtros aplicados ao QIIME, com um valor médio de 27.487 leituras/amostra, e um comprimento de sequência de 300 pb. A curva de rarefação gerada a partir das OTUs indicaram alta cobertura amostral, portanto as amostras sequenciadas alcançaram a profundidade necessária para observar todos os táxons e, assim, inferir a diversidade total de uma comunidade amostrada. Usando os índices ACE, Chao1 Shannon e Simpson, foi observado uma diminuição da riqueza e da diversidade das espécies dos pintinhos da propriedade 01 com 07 dias de idade pela RSS (Fig. 1A e 1B). No grupo dos pintinhos da propriedade 01 com e sem RSS houve diferença significativa no índice de Shannon ($p=0,04$).

A diversidade beta foi gerada medindo as distâncias de Bray-Curtis entre diferentes grupos em relação à RSS. Análise com Adonis baseada na matriz de distância Weighted UniFrac revelou que houve diferença estatística significativa no grupo da propriedade 01 com RSS e sem RSS ($R^2= 0.12$, $P=0.038$), já na propriedade 02 não houve diferença estatística entre o grupo com RSS e sem RSS ($R^2= 0.08$, $P=0.6$). Com base na ordenação da matriz de distância gerada usando o algoritmo complementar de Bray-Curtis, a PCoA mostrou claramente que as amostras com RSS estavam separadas das amostras sem RSS tanto na propriedade 01 quanto na 02 (Fig. 2A e 2B).

4.2.2. Composição taxonômica das bactérias dos pintinhos da propriedade 01.

O filo mais abundante foi Firmicutes (78%) seguido de Proteobacteria e Actinobacteriota tanto nos pintinhos sem RSS quanto nos pintinhos com a RSS (Fig.3). Não houve diferença significativa ($P>0.05$) entre pintinhos sem RSS e com RSS no nível de filo. No nível de família observou-se que no grupo dos pintinhos com RSS em comparação ao grupo dos pintinhos sem RSS teve uma abundância maior de Clostridiaceae (48% e 4%) e Enterococcaceae (6% e 1%), enquanto a abundância de Lactobacillaceae (23%) foi menor nos pintinhos com RSS em comparação com os pintinhos sem RSS (60%) (Fig 3). A abundância relativa da família Clostridiaceae nas amostras com RSS foi significativamente maior do que nas amostras sem RSS ($P=0,008$), enquanto a família Lactobacillaceae nas amostras com RSS foi significativamente menor do que nas amostras sem RSS ($P=0,008$). A abundância em nível de gêneros foi dominada pelo *Candidatus_Arthromitus* (47%) nos pintinhos com RSS em comparação sem RSS (4%), *Clostridium_sensu_stricto_1*(0,3%) e *Enterococcus* (1%) foi enriquecido no grupo com RSS, enquanto para *Lactobacillus* (23%) a abundância foi reduzida

no grupo RSS em comparação com o grupo sem RSS (60%) (Fig. 4). A abundância relativa dos gêneros *Candidatus_Arthromitus* ($P=0,0006$) e *Clostridium_sensu_stricto_1* ($P= 0,03$) foram significativamente maiores nas amostras com RSS do que nas amostras sem RSS. A abundância relativa do gênero *Lactobacillus* nas amostras com RSS foi significativamente menor do que nas amostras sem RSS ($P=0,008$). O mapa de calor (Heatmap em inglês) exibiu a abundância relativa de táxons bacterianos dos grupos de pintinhos sem RSS e com RSS (fig. 5).

DESeq2 foi usado para identificar filotipos diferencialmente abundantes nos pintinhos acometidos pela RSS. Foi comparada as OTUs do grupo com RSS com o grupo sem RSS. Quatro famílias diferencialmente abundantes foram observadas em maior abundância no grupo sem RSS Lactobacillaceae, Lachnospiraceae, Erysipelatoclostridiaceae, Enterobacteriaceae, enquanto a família Clostridiaceae, cujo o gênero *Clostridium_sensu_stricto_1* e *Candidatus_Arthromitus* foi abundante no grupo RSS em comparação sem RSS (Fig. 6).

4.2.3. Composição taxonômica das bactérias dos pintinhos da propriedade 02

Nesses pintinhos, o filo mais abundante foi Firmicutes (83%) seguido de Proteobacteria, tanto nos quatro pintinhos sem RSS quanto nos seis pintinhos com a RSS (Fig.7). No nível de família houve uma abundância maior de Lactobacillaceae (74%) no grupo com RSS em comparação ao grupo sem RSS (63%), enquanto a abundância de Enterobacteriaceae (3%) foi menor nos pintinhos com RSS em comparação com os pintinhos sem RSS (28%) (Fig 7). A abundância em nível de gêneros foi dominada pelo *Lactobacillus* (74%) nos pintinhos com RSS em comparação com os pintinhos sem RSS (63%), enquanto *Escherichia-Shigella* (2,7%) a abundância foi reduzida no grupo com RSS em comparação sem RSS (14%) (Fig.8). Não houve diferença estatística na abundância relativa em nenhum dos táxons analisados entre as amostras com RSS e sem RSS ($P>0.05$). O mapa de calor (Heatmap em inglês) exibiu a abundância relativa de táxons bacterianos dos grupos de animais sem RSS e com RSS (Fig. 9).

DESeq2 foi usado para identificar filotipos diferencialmente abundantes nos pintinhos acometidos pela RSS. Foi comparada as OTUs do grupo com RSS com o grupo sem RSS. Duas famílias diferencialmente abundantes foram observadas em maior abundância no grupo sem RSS: Enterobacteriaceae, Lactobacillaceae, enquanto a família Lactobacillaceae foi abundante no grupo com RSS em comparação sem RSS (Fig. 10).

4.3. Discussão

A investigação da microbiota intestinal dos pintinhos com RSS e sem RSS revelou alterações na microbiota ileal dos pintinhos da propriedade 01 e 02 com RSS. Dentre os grupos, os pintinhos da propriedade 01 com RSS tiveram alterações relevantes como a diminuição da diversidade alfa, a qual tem sido associada às doenças inflamatórias intestinais (Li et al., 2017). Além disso, houve aumento do gênero *Clostridium sensu stricto* 1, considerado patogênico (Yang et al., 2019). Os pintinhos da propriedade 02 com RSS tiveram alterações na microbiota ileal como aumento do gênero *Lactobacillus*, o qual pode estimular macrófagos a produzir fatores antivirais (Shojadoost et al., 2017).

O intestino tem importância primordial para a saúde das aves. No entanto, poucos estudos se concentraram na complexidade da comunidade microbiana intestinal em associação com infecção viral (Luo et al., 2021). A microbiota intestinal saudável tem como características grande diversidade, estabilidade, resistência, resiliência e a interação simbiótica com o hospedeiro (Rinninella et al., 2019). O equilíbrio do ecossistema do intestino pode ser interrompido por perturbações inflamatórias (Fassarella et al., 2021) e infecções virais, fúngicas, parasitárias e bacterianas (Perumbakkam et al., 2014), causando reduções significativas na riqueza funcional e diversidade microbiana, bem como impactando a saúde metabólica (Fassarella et al., 2021). No presente estudo foi constatado que, tanto a riqueza quanto a diversidade microbiana (estimada pelos índices de Chao1, ACE, Simpson e Shannon), tiveram declínio nos pintinhos da propriedade 01 com RSS, indicando a disbiose microbiana do hospedeiro. Fenômenos semelhantes, também foram encontrados em outras doenças virais que acometem aves de produção, como o vírus da influenza aviária H9N2 (Yitbarek et al., 2018), vírus da doença de Newcastle (Cui et al., 2018) e vírus da doença de Marek (Perambakkam et al., 2014). Outro fator importante que leva ao quadro de disbiose intestinal são alterações morfológicas do tecido intestinal como atrofia e fusão das vilosidades intestinais, necrose e dilatação das criptas das células epiteliais e infiltrado inflamatório na lâmina própria da mucosa (Teirlynek et al., 2011). Estas lesões estavam presentes no intestino delgado dos pintinhos com RSS do presente estudo. Estudos sobre microbiota em aves com enterite relacionada à RSS não foram encontrados.

Há evidências que a disbiose causa elevação da resposta imune inata o que pode provocar inflamação crônica e conseqüentemente tornar a função epitelial irregular (Kim e Jazwinski, 2018), a qual pode contribuir para o desenvolvimento de distúrbios crônicos, como síndrome metabólica ou doença inflamatória intestinal (Sommer et al., 2017). No presente estudo, ao contrário do resultado observado na propriedade 01, os pintinhos da propriedade 02

não apresentaram disbiose, possivelmente a perturbação que ocorreu no intestino delgado dessas aves com RSS não foi suficiente para causar tal alteração. A variação da composição da microbiota intestinal pode ser explicada devido a diferentes características do hospedeiro e fatores ambientais como alojamento, cama, acesso ao alimento e o clima que influenciam diretamente na colonização e no estabelecimento das bactérias no intestino das aves (Kers et al., 2018).

No presente estudo, a diversidade microbiana do íleo demonstrou dominância do filo Firmicutes, seguido por Proteobacteria e Actinobacteriota, tanto no grupo dos pintinhos da propriedade 01 e 02 sem RSS quanto nos acometidos por RSS. Esse resultado pode ser comparado a estudos anteriores, nos quais Firmicutes e Proteobacteria são os filos dominantes em frangos de corte saudáveis (Xiao et al., 2017; Li et al., 2018; Li et al., 2022).

Entre os gêneros bacterianos identificados com maior abundância nos pintinhos com RSS da propriedade 01 no presente trabalho, está o *Candidatus Arthromitus* spp., também conhecido como bactéria filamentosa segmentada (SFB inglês “*Segmented filamentous bacterium*”), a qual é membro indígena da microbiota em desenvolvimento no intestino delgado de animais, incluindo aves comerciais (Danzeisen et al., 2016). Essas bactérias são observadas tanto no lúmen quanto no muco intestinal do íleo nos primeiros dias de vida de pintinhos de corte (Richards-Rios et al., 2020). São bactérias gram-positivas, formadoras de esporos, de forma filamentosa longa, consistindo em estruturas segmentadas. Na taxonomia, pertence ao filo Firmicutes, ordem Clostridiales, e são únicos em relação a outros Clostridia, pois possuem genomas reduzidos e, portanto, são altamente dependentes de seu hospedeiro para muitas funções metabólicas (Danzeisen et al., 2016). Em mamíferos, as SFBs atuam na maturação da barreira imune do intestino do hospedeiro, induzindo respostas imunes inatas e adaptativas. São mais conhecidas por sua capacidade de induzir a diferenciação de células T CD4⁺ *naïve* em células Th17 CD4⁺ antígeno-específicas (Hedblom et al., 2018). As células Th17 secretam interleucina-17 (IL-17) e IL-22 e têm papéis significativos na proteção do hospedeiro contra infecções bacterianas e fúngicas, particularmente nas superfícies das mucosas. As células Th17 também têm um potente potencial inflamatório e, portanto, são os principais mediadores de doenças autoimunes (Ivanov et al., 2009). Pesquisadores evidenciaram que o desequilíbrio de células Th17 aumentam a intensidade da inflamação sistêmica, o que prejudica a digestão e a absorção de nutrientes, com conseqüente redução no ganho de peso corporal em frangos de corte (Ma et al., 2023). Frangos de corte desafiados com enterite necrótica apresentaram no íleo aumento da proporção de células Th17 e a proporção de células Th17/Treg e aumento da

produção das citocinas pró-inflamatórias IL-17 e Th17/IL-10 (Song et al., 2022). Muitos trabalhos, em mamíferos, relatam o aumento da abundância de *Candidatus Arthromitus* após a infecção por helmintos (Rausch et al., 2013; Su et al., 2018; Afrin et al., 2019) e fungos (Rabino et al., 2018), sugerindo ser causada devido ao tipo da resposta imune. Um estudo investigou a microbiota intestinal de canários, da espécie *Serinus canaria domestica*, infectados por *Macrorhabdus ornithogaster*, cujo resultado foi semelhante ao encontrado no presente estudo. Na análise do metagenoma fecal a bactéria identificada com maior frequência foi o *Candidatus Arthromitus* (Robino et al., 2019). Em camundongos, aparentemente, as SFB foram suficientes para proteger esses animais contra a infecção por Rotavírus. A colonização do íleo por SFB induziu alterações na expressão gênica do hospedeiro e acelerou a renovação celular epitelial. A incubação do Rotavírus com fezes contendo SFB reduziu a infectividade *in vitro*, sugerindo neutralização direta desse vírus. Assim, independentemente das células imunes, os SFB conferem proteção contra certas infecções entéricas (Shi et al., 2019).

A análise de DESeq2 da propriedade 01 identificou o aumento de *Clostridium sensu stricto* 1 no grupo com RSS, além de um aumento significativo da abundância relativa desse gênero no mesmo grupo. O gênero *Clostridium* tem vários clusters classificados pela análise filogenética, entre os quais o cluster I, *Clostridium sensu stricto* 1, que são agrupados em torno da espécie tipo *Clostridium butyricum* e pertencem a família Clostridiaceae (Rajilic-Stojanovic e Vos, 2014; Alou et al., 2017). Membros do *Clostridium sensu stricto* 1 são geralmente reconhecidos como patogênicos e interpretados como indicadores de uma microbiota menos saudável, como por exemplo o *Clostridium perfringens* e outros clostrídios verdadeiros (Rajilic-Stojanovic e Vos, 2014; Yang et al., 2019). Recentemente, foi relatado um supercrescimento de *Clostridium sensu stricto* 1 associado a lesões de enterite necrótica, no jejuno de frangos de corte desafiados com *Clostridium perfringens* e *Eimeria* (Yang et al., 2019). Mais estudos devem ser realizados para esclarecer se existe interação entre o(s) vírus responsável(is) pela RSS e o gênero *Clostridium sensu stricto* 1 e se o aumento da abundância dessa bactéria está envolvido na patogênese da RSS.

No presente estudo, houve diminuição na abundância do gênero *Lactobacillus* nos pintinhos com RSS na propriedade 01. Esse gênero é um dos mais abundantes no sistema gastrointestinal das aves de produção (Wei et al., 2013), e estão diretamente envolvidos na saúde intestinal, pois auxiliam na fermentação do carboidrato para produção de ácido lático (Dempsey e Corr, 2022). São também imunomoduladores, pois interagem com a resposta imune inata e adaptativa. Esses microrganismos protegem a barreira intestinal contra infecções,

promovendo a produção de muco e proteínas, secretam substâncias antimicrobianas, como ácidos graxos de cadeia curta (SCFAs), bacteriocinas e peróxido de hidrogênio. Essas substâncias inibem a multiplicação, impedem a adesão de patógenos, modulam a resposta imune e competem por sítios de ligação (Dempsey e Corr, 2022). Portanto, a supressão de lactobacilos é regularmente considerada benéfica para o crescimento e colonização de patógenos entéricos (Yang et al., 2018). No presente estudo, os pintinhos da propriedade 01 tanto na análise de DESeq2 quanto a abundância relativa do gênero *Lactobacillus* no grupo com RSS foi menor do que o grupo sem RSS. A diminuição de *Lactobacillus* também foi observada em outros trabalhos com aves de produção após o desafio com infecção por *Eimeria tenella* (Macdonald et al., 2017), vírus da influenza aviária H9N2 (Li et al., 2018), *Clostridium perfringens* (Yang et al., 2019), e vírus da doença de Newcastle (Tong et al., 2022). Entretanto, os pintinhos com RSS na propriedade 02 tiveram um resultado contrário, nos quais foi detectado aumento na abundância do gênero *Lactobacillus* em comparação com os pintinhos sem RSS. Vários fatores podem estar envolvidos nesse resultado, incluindo aspectos relacionados ao hospedeiro e ao ambiente ou à forma como a bactéria induz respostas anti e pró-inflamatórias em um processo infeccioso. Dentre os aspectos relacionados ao hospedeiro e ao ambiente que podem alterar a composição da microbiota das aves estão a linhagem e o sexo, sistema imunológico, morfologia intestinal, aquisição da microbiota, a densidade de aves no lote, variações de temperatura, uso de promotores de crescimento, antibioticoterapia, a nutrição como tamanho das partículas da ração, micronutriente, enzimas, entre outros (Carrasco et al., 2019). Os aspectos relacionados aos lactobacilos são inúmeros como a realização da imunomodulação intestinal, diferentes linhagens dessa bactéria podem induzir respostas pró-inflamatórias com estimulação na produção de IL12 por células dendríticas e está associada à indução de respostas T-helper 1 (Th1). Além disso, a IL-12 induz a produção de IFN- γ pelas células T e pelas células NK. Outras linhagens estimulam respostas anti-inflamatórias como a produção de IL10, IL4, que regulam negativamente a apresentação de antígenos e inibe a ativação de macrófagos e, portanto, a produção de moléculas pró-inflamatórias como IL-12, quimiocinas e induz resposta T helper 2 (Th2) (Perdigón et al., 2002; Wells, 2011). Estudos recentes, descrevem o importante papel da microbiota comensal na modulação da imunidade inata antiviral à infecção sistêmica por vírus entéricos. Bactérias comensais protegem contra a infecção viral sistêmica, promovendo respostas de interferon tipo I (IFN tipo I) em células imunes inatas periféricas, principalmente fagócitos mononucleares. *Lactobacillus* isolado de galinhas livres de patógenos específicos (SPF) pode restaurar a ativação de macrófagos em aves com depleção da microbiota intestinal e a resposta de IFN tipo I dependente de Interferon-

alpha/beta receptor (IFNAR) para limitar a infecção pelo vírus da bronquite infecciosa (IBV). Além disso, metabólitos de exopolissacarídeos de *Lactobacillus* spp. poderia induzir a produção de IFN- β (Yang et al., 2021; Yin et al., 2022). Em outro estudo foi relatado que *L. acidophilus*, *L. reuteri* e *L. salivarius*, quando usados sozinhos ou em combinação, induzem a resposta antiviral via macrófagos de galinha ao vírus da influenza aviária (Shojadoost et al., 2017). São necessárias mais investigações sobre a interação do *Lactobacillus* e os vírus entéricos causadores da RSS, para esclarecer o mecanismo imunológico envolvido e dessa maneira compreender se há alguma função antiviral específica dos *Lactobacillus* ou se pode existir alguma interação positiva que influencia na infecção pelo(s) vírus causador da RSS.

4.4. Conclusão

No presente estudo foi possível estabelecer uma melhor compreensão sobre as alterações da microbiota do íleo de pintinhos com RSS. A disbiose ileal ocorreu em pintinhos da propriedade 01, o que reforça a importância de entender melhor a interação entre o(s) vírus relacionado(s) com RSS e a microbiota intestinal. A alteração da composição da microbiota dos pintinhos com RSS foi dominada pelo aumento de bactérias consideradas benéficas ao intestino, imunomoduladoras e por aumento na abundância de *Clostridium sensu stricto* 1, que está relacionado com doença como a enterite necrótica em frangos de corte. Mais estudos devem ser realizados para esclarecer os mecanismos subjacentes a interação microbiota-vírus e o tipo de resposta imune induzida nessa relação.

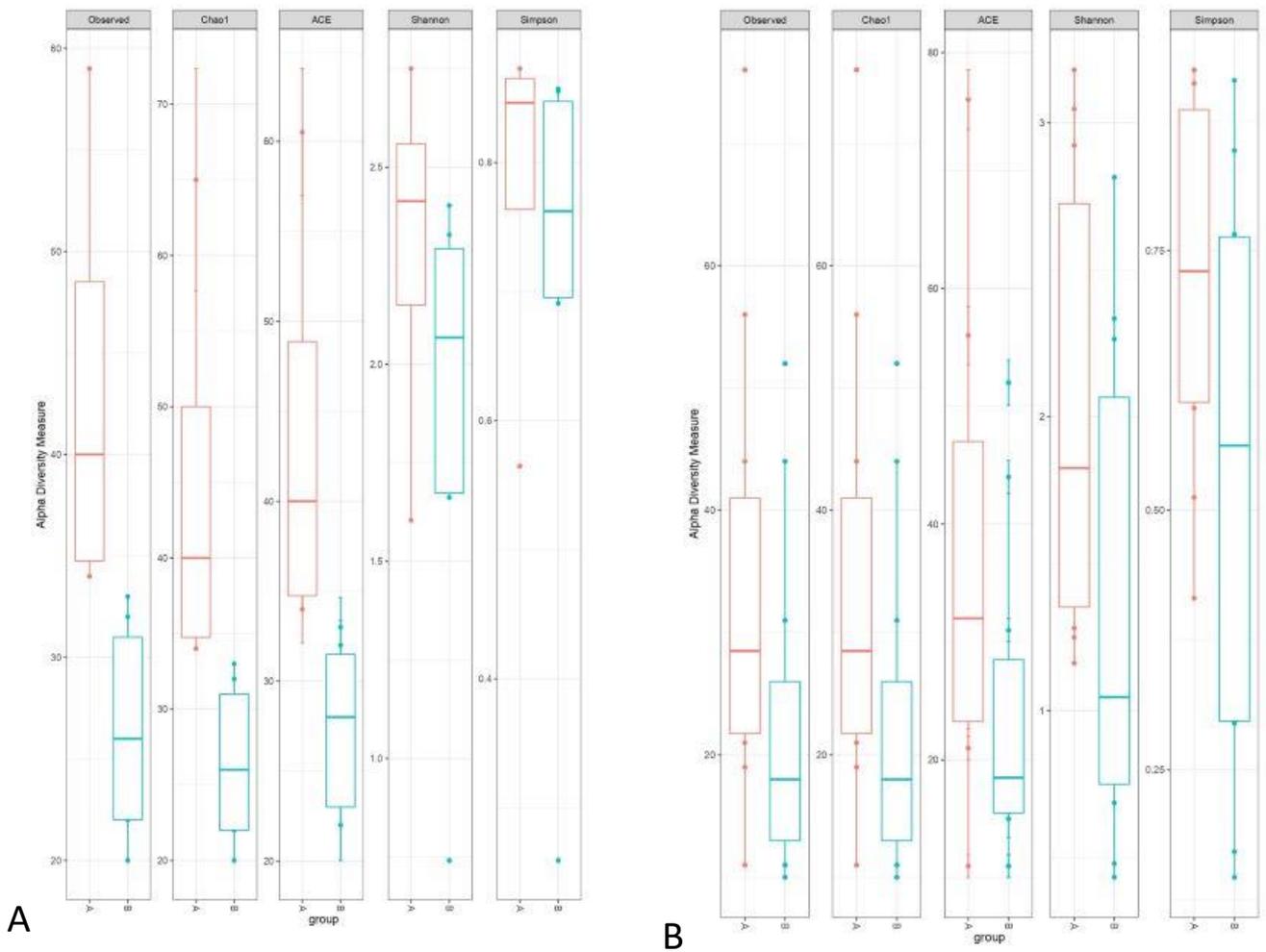


Figura 1: Gráficos de diversidade alfa para cada grupo, sendo (A) pintinhos da propriedade 02 com 6 dias de idade e (B) pintinhos da propriedade 01 com 7 dias de idade. Gráfico de riqueza de espécies observadas (observed) e medidas de diversidade alfa: Chao1, ACE (Estimador de riqueza de espécies), testes de Shannon e Simpson (índices de diversidade das espécies). O boxplot vermelho indica o grupo pintinhos sem RSS e o azul o grupo com RSS. Não foram observadas diferenças significativas usando o teste de Mann Whitney ($P > 0,05$) nos pintinhos da propriedade 02. Nos pintinhos da propriedade 01 houve diferença significativa no índice de Shannon ($p=0,04$).

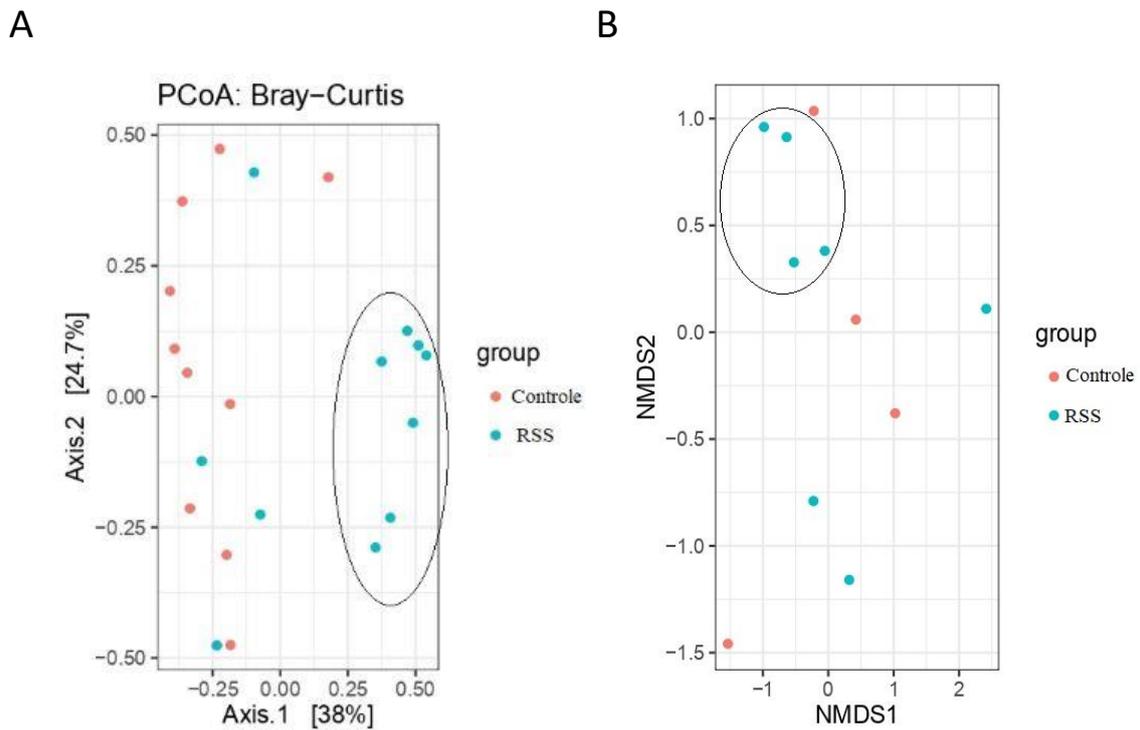


Figura 2: Análise de coordenadas principais UniFrac ponderado. **(A)** Pintinhos da propriedade 01 com 7 dias de idade e **(B)** Pintinhos da propriedade 02 com 6 dias de idade. Cada ponto representa uma amostra (pintinhos). Vermelho representa o grupo pintinhos sem RSS e o azul o grupo dos pintinhos com RSS. As amostras pertencentes ao mesmo grupo e mais próximas umas das outras e a distância maior entre pontos em grupos diferentes representam um modelo de classificação bom. As amostras marcadas em círculos é a formação de um cluster próximo do grupo com RSS.



Figura 3: Gráfico de barra empilhado da abundância dos principais filos e famílias presente no óleo de pintinhos da propriedade 01 de 7 dias de idade, grupo A (sem RSS) e grupo B (com RSS), cada coluna representa um pintinho.

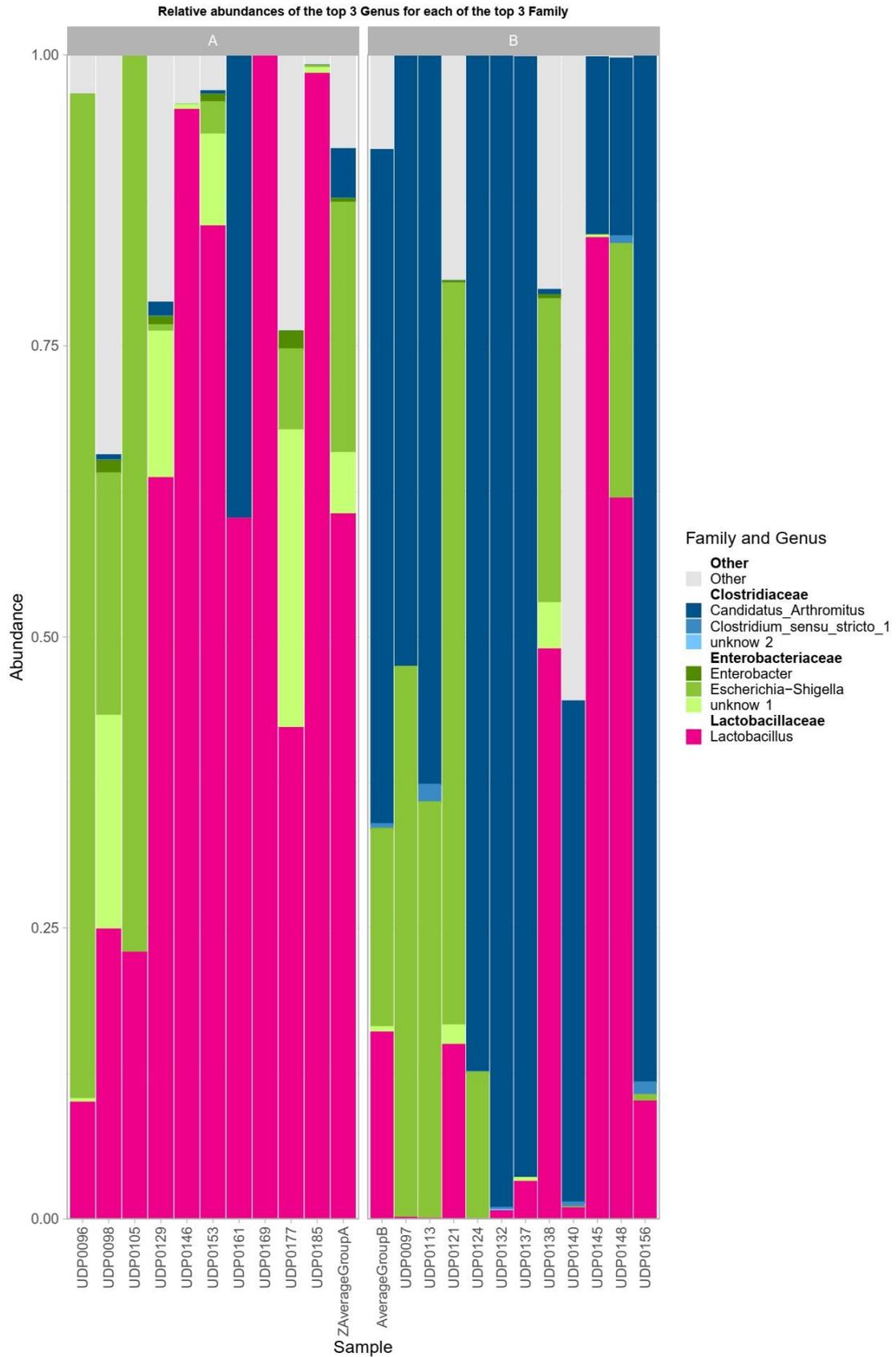


Figura 4: Gráfico de barra empilhado da abundância das principais famílias e gêneros presente no óleo de pintinhos da propriedade 01 com 7 dias de idade, grupo A (sem RSS) e grupo B (com RSS), cada coluna representa um pintinho.

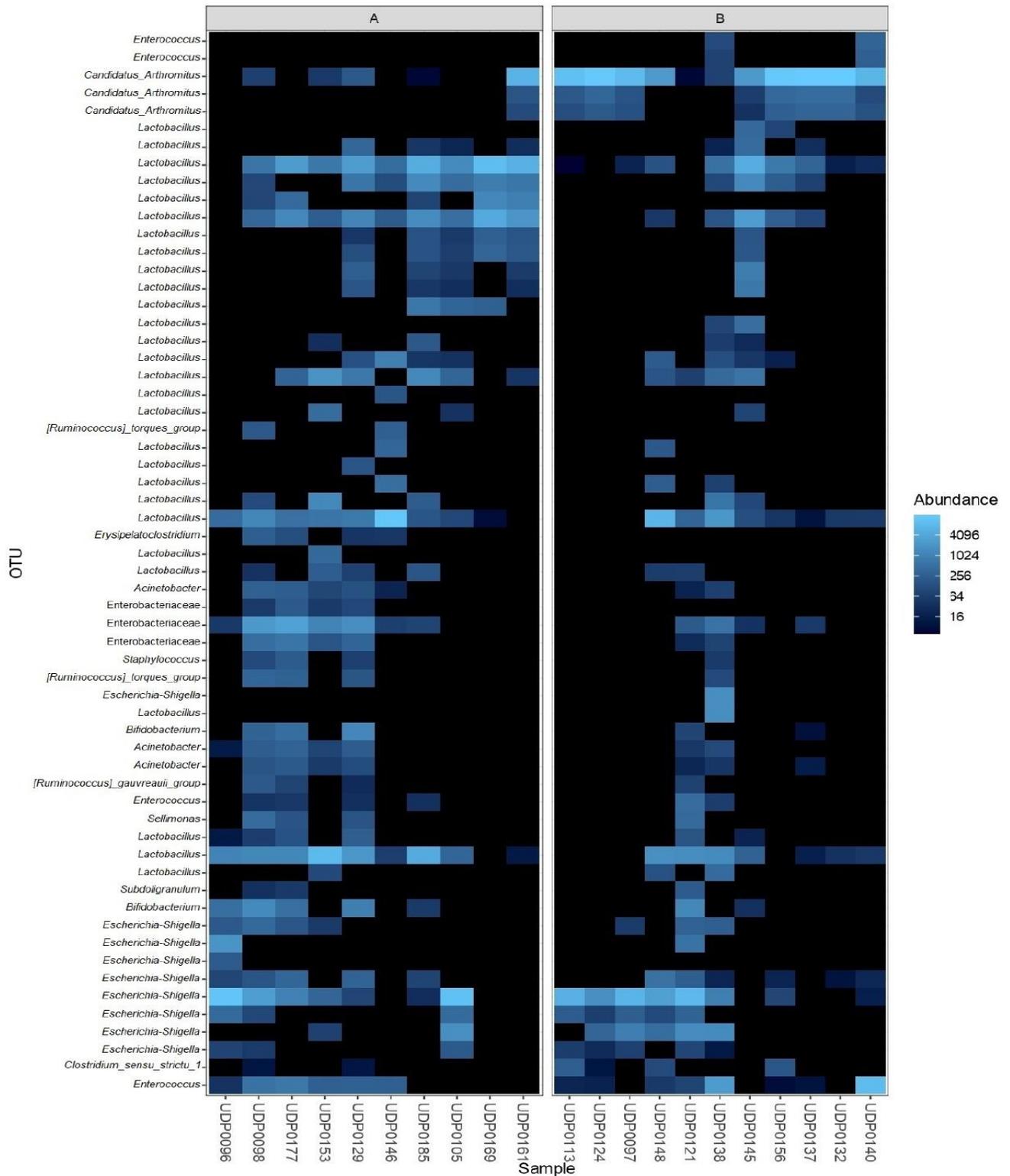


Figura 5: Heatmap demonstrando a abundância dos gêneros no íleo dos pintinhos da propriedade 01 com 7 dias de idade. O grupo A representa os pintinhos sem RSS e o grupo B os pintinhos com RSS, cada coluna representa um pintinho.

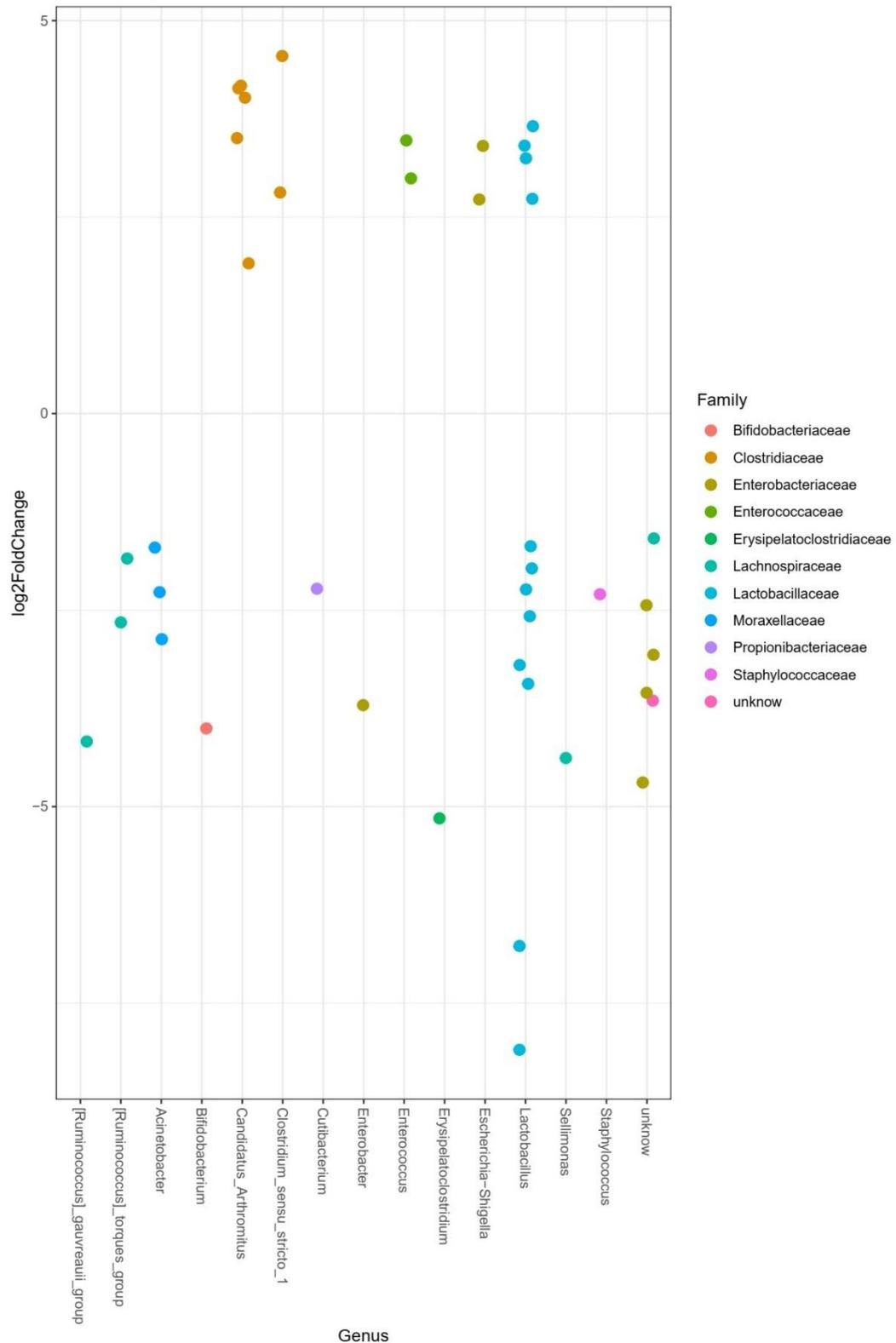


Figura 6: Plot de OTUs diferencialmente abundantes nos grupos com RSS *versus* sem RSS de pintinhos da propriedade 01 com 7 dias de idade ($p < 0,05$) de acordo com a análise DESeq2. As OTUs significativas são representadas por pontos de dados únicos, agrupados por gênero no eixo x e por cor de acordo com a família taxonômica de origem da OTU.

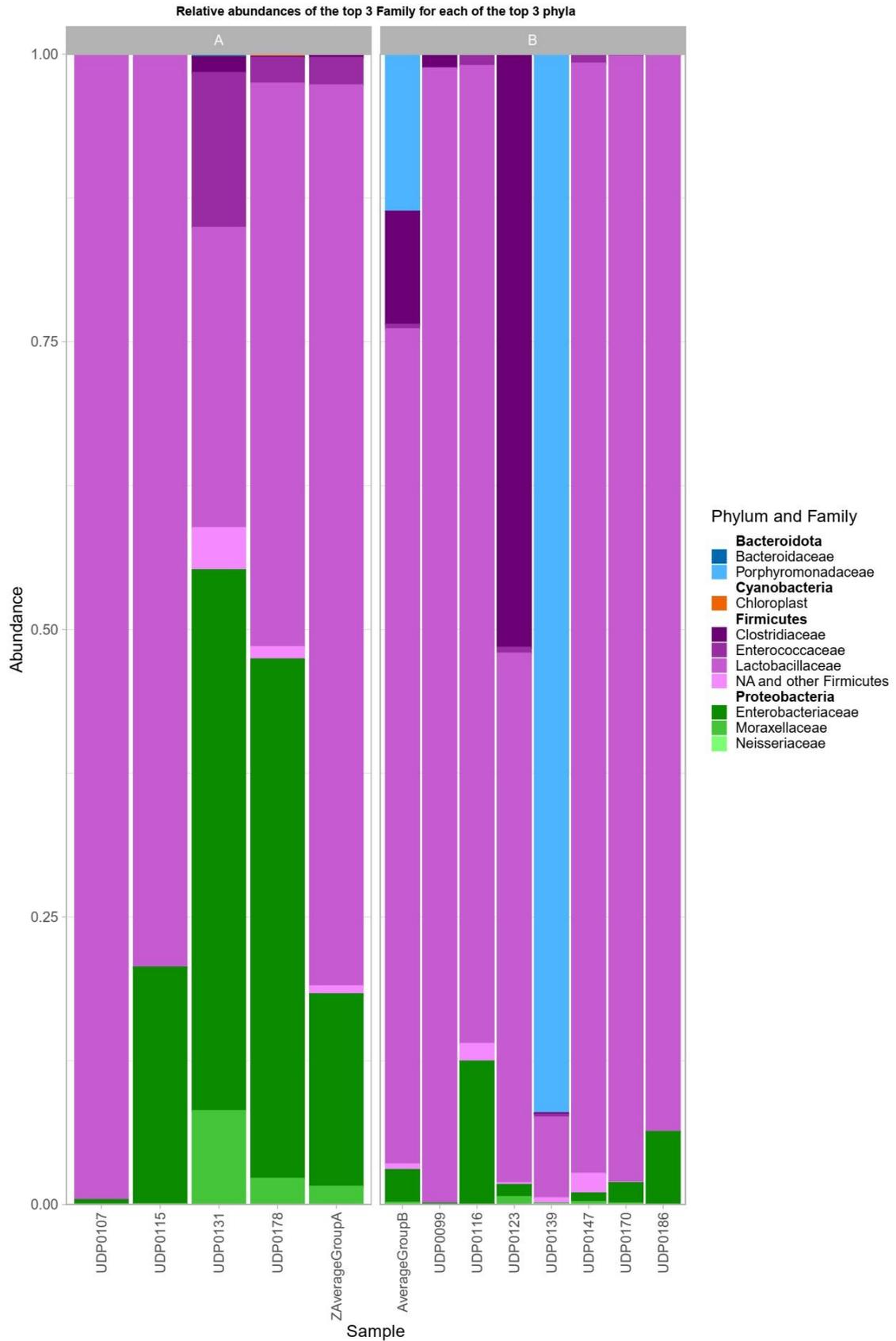


Figura 7: Gráfico de barra empilhado da abundância dos principais filos e famílias presente no óleo de pintinhos da propriedade 02 com 6 dias de idade, grupo A (sem RSS) e grupo B (com RSS), cada coluna representa um pintinho.

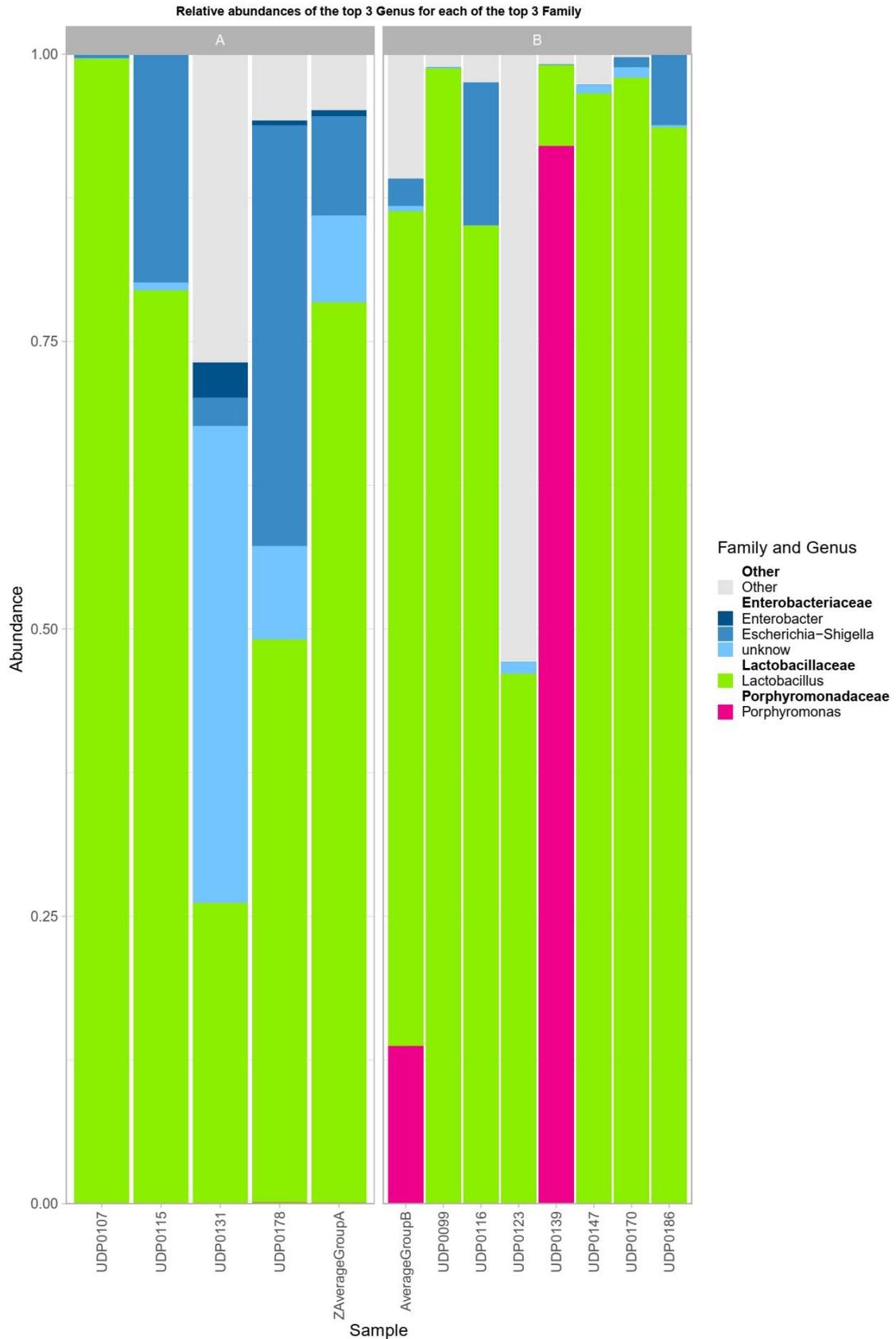


Figura 8: Gráfico de barra empilhado da abundância das principais famílias e gêneros presente no íleo de pintinhos da propriedade 02 com 6 dias de idade, grupo A (sem RSS) e grupo B (com RSS), cada coluna representa um pintinho.

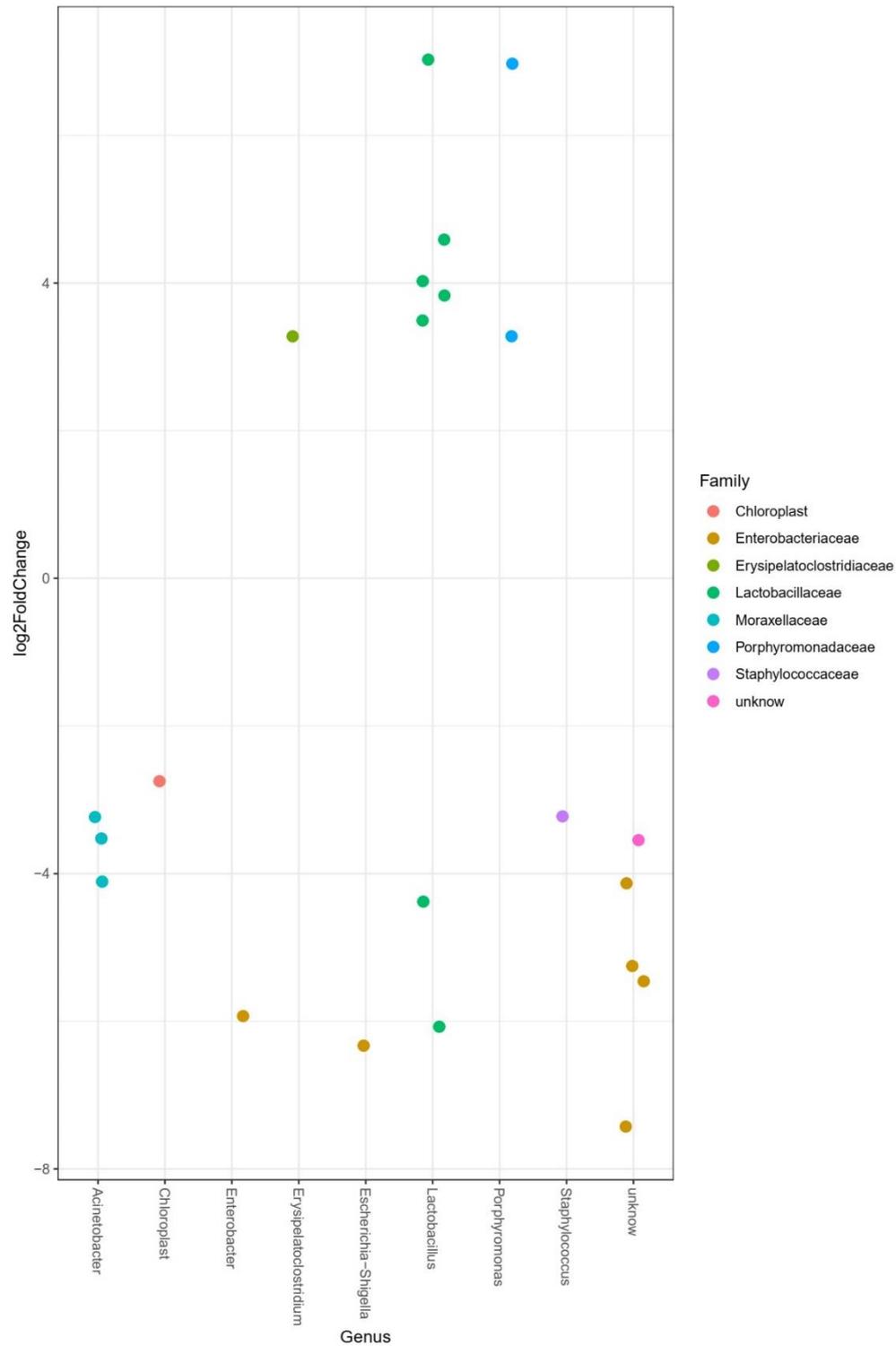


Figura 10: Plot de OTUs diferencialmente abundantes nos grupos com RSS versus sem RSS de pintinhos da propriedade 02 com 6 dias de idade ($p_{adj} < 0,05$) de acordo com a análise DESeq2. As OTUs significativas são representadas por pontos de dados únicos, agrupados por gênero no eixo x e por cor de acordo com a família taxonômica de origem da OTU.

4.5. Referências

- ABAI DULLAH, M.; PENG S.; KAMRAN, M. et al. (2019). *Current findings on gut microbiota mediated immune modulation against viral diseases in chicken*. *Viruses* v. 11, p.1-14.
- AFRIN, T.; MURASE, K.; KOUNOSU, A. et al. (2019). *Sequential changes in the host gut microbiota during infection with the intestinal parasitic nematode *Strongyloides venezuelensis**. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. v.19, p.1-11.
- ALOU, M. T.; NDONGO, S.; FRÉGÈRE, L. et al. (2018). *Taxonomomic description of four new *Clostridium* species isolated from human gut: ‘*Clostridium amazonitimonense*’, ‘*Clostridium merdae*’, ‘*Clostridium massilidielmoense*’ and ‘*Clostridium nigeriense*’*. *New Microbe and New Infect.*v. 21, p. 128–139.
- CARRASCO, J. M. D.; CASANOVA, N. A.; MIYAKAWA, M. E. F. (2019). *Microbiota, gut health and chicken productivity: What is the connection?* *Microorganisms*. v. 7, p.1-15.
- CUI, N.; HUANG, X.; KONG, Z. et al. (2018). *Newcastle disease virus infection interferes with the formation of intestinal microflora in newly hatched specific-pathogen-free chicks*. *Frontiers in Microbiology*. v.9, p.1-7.
- DANZEISEN, J. L.; CALVERT, A. J.; NOLL, S. L. et al. (2013). *Succession of the turkey gastrointestinal bacterial microbiome related to weight gain*. *PeerJ*. v.1, p.1-22.
- DAY, J. MICHAEL; ZSAK, LASZLO. (2013). *Recent progress in the characterization of avian enteric viroses*. *Avian Diseases*, v. 57, p. 573–580.
- DEMPSEY, Elaine.; CORR, S. C. (2022). *Lactobacillus spp. for gastrointestinal health: current and future perspectives*. *Frontiers in Immunology*. v.13, p.1-15.
- DJUKOVIC, A.; GARZÓN, M. J.; CANLET, C. et al. (2022). *Lactobacillus supports Clostridiales to restrict gut colonization by multidrug-resistant Enterobacteriaceae*. *Nature Communications*. v.13, p. 1-12.
- FASSARELLA, M.; BLAAK, E. E.; PENDERS, J. et al. (2021). *Gut microbiome stability and resilience: elucidating the response to perturbations in order to modulate gut health*. *Gut*. v. 70, p.595–605.

- FORTE, C.; ACUTI, G.; MANUALI, E. et al. (2016). *Effects of two different probiotics on microflora, morphology, and morphometry of gut in organic laying hens*. Poultry Science, v. 95, p. 2528–2535.
- GE, Z.; FENG, Y.; WOODS, S. E. et al. (2015). *Spatial and temporal colonization dynamics of segmented filamentous bacteria is influenced by gender, age and experimental infection with Helicobacter hepaticus in Swiss Webster mice*. Microbes and Infection. v.17, p.16-22.
- GOODWIN, M. A.; DAVIS, J. F.; McNULTY, M. S. et al. (1993). *Enteritis (So-Called Runting Stunting Syndrome) in Georgia broiler chicks*. Avian Diseases, v. 37, p. 451-458.
- HARPER, A.; VIJAYAKUMAR, V.; OUWEHAND, A. C. et al. (2021). *Viral infections, the microbiome, and probiotics*. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. v.10, p.1-21.
- HEDBLÖM, G. A.; REILAND, H. A.; SYLTE, M. J. et al. (2018). *Segmented filamentous bacteria –metabolism meets immunity*. Frontiers in Microbiology. v.9, p.1-9.
- HOLM, J. B.; SOROBETEA, D.; KIILERICH, P. et al. (2015). *Chronic Trichuris muris infection decreases diversity of the intestinal microbiota and concomitantly increases the abundance of Lactobacilli*. PLoS ONE. v. 10, p. 1-22.
- IVANOV, I. I.; ATARASHI, K.; MANEL, N. et al. (2009). *Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria*. Cell. v.139, p. 485–498.
- KERS, J. G.; VELKERS, F. C.; FISCHER, E. A. J. et al. (2018). *Host and environmental factors affecting the intestinal microbiota in chickens*. Frontiers in Microbiology. v.9, 1-14.
- KIM, S.; JAZWINSKI, S. M. (2018). *The gut microbiota and healthy aging*. Gerontology. v.64, p.513–520.
- KOHL, K. D. (2012). *Diversity and function of the avian gut microbiota*. Journal of Comparative Physiology B. v.182, p.591–602.
- KOUWENHOVEN, B.; VERTC, M.; VAN ECK, J.H.H. (1978). *Runting and leg weakness in broilers; involvement of infectious factors*. Veterinary Science Communications, v.2, p. 253—259.
- LI, Z.; WANG, W.; LIU D. et al. (2017). *Effects of Lactobacillus acidophilus on gut microbiota composition in broilers challenged with Clostridium perfringens*. PLOS ONE. v. 12, p.1-16.

- LI, H.; LIU, X.; CHEN, F. et al. (2018). *Avian Influenza Virus subtype H9N2 affects intestinal microbiota, barrier structure injury, and inflammatory intestinal disease in the chicken ileum*. *Viruses*. v.10, p.1-14.
- LI, M. H.; MENG, J. X.; WANG, W. et al. (2022). *Dynamic description of temporal changes of gut microbiota in broilers*. *Poultry Science*. v.101, p.1-14.
- LI, Z.; ZHOU, J.; LIANG, H. et al. (2022). *Differences in alpha diversity of gut microbiota in neurological diseases*. *Frontiers in Neuroscience*. v.16, p. 1-13.
- LOKAPIRNASARI, W. P.; PRIBADI, T. B.; ARIF, A. A. et al. (2019). *Potency of probiotics Bifidobacterium spp. and Lactobacillus casei to improve growth performance and business analysis in organic laying hens*. *Veterinary World*. v.12, p.860-867.
- LUO, Q.; LEI, X.; XU, J. et al. (2021). *An altered gut microbiota in duck-origin parvovirus infection on cherry valley ducklings is associated with mucosal barrier dysfunction*. *Poultry Science*. v.100, p.1-17.
- MA, Z.; AKHTAR, M.; PAN, H. et al (2023). *Fecal microbiota transplantation improves chicken growth performance by balancing jejunal Th17/Treg cells*. *Microbiome*. v.11, p.1-16.
- MACDONALD, S. E.; NOLAN, M. J.; HARMAN, K. et al. (2017). *Effects of Eimeria tenella infection on chicken caecal microbiome diversity, exploring variation associated with severity of pathology*. *PLoS ONE*.v.12, p.1-17.
- MANOR, O.; DAI, C. L.; KORNILOV, S. A. et al. (2020). *Health and disease markers correlate with gut microbiome composition across thousands of people*. *Nature Communications*. v.11, p. 1-12.
- METTIFOGO E.; NUÑEZ, L.F.N.; CHACÓN, J.L. et al. (2014). *Emergence of enteric viruses in production chickens is a concern for avian health*. *Scient. World J*. v.2014, p.1-8.
- MONTGOMERY, R.D.; BOYLE, C.R.; MASLIN, W.R.; MAGEE, D.L. (1996) *Attempts to reproduce a runting/stunting-type syndrome using infectious agents isolated from affected Mississippi broilers*. *Avian Diseases*., v.41, p.80–92.
- OLIVEIRA, L. B.; STANTON, J. B.; ZHANG, J. et al. (2021). *Runting and stunting syndrome in broiler chickens: histopathology and association with a novel picornavirus*. *Veterinary Pathology*. v. 58, p.123-135.

- OLSEN, D.E. Isolation of a reovirus-like agent from broiler chicks with diarrhoea and stunting. Proceedings of the 26th Western Poultry Disease Conference, Davis California, p. 131-139, 1977.
- PERDIGON, G.; GALDEANO, C. M.; VALDEZ, J. C. et al. (2002). *Interaction of lactic acid bacteria with the gut immune system*. European Journal of Clinical Nutrition. v.56, p.21-26.
- PERROTTA, G. (2021). *The intestinal microbiota: towards a multifactorial integrative model. Eubiosis and dysbiosis in morbid physical and psychological conditions*. Archives of Clinical Gastroenterology. v. 7, p.24-35.
- PERUMBAKKAM, S.; HUNT, H. D.; CHENG, H. H. et al. (2014). *Marek's disease virus influences the core gut microbiome of the chicken during the early and late phases of viral replication*. FEMS Microbiology Ecology. v. 90, p. 300–312.
- PFEIFFER, J. K.; VIRGIN, H. W. (2016). *Transkingdom control of viral infection and immunity in the mammalian intestine*. Science. v.351, p.239-245.
- PICKARD, J. M.; ZENG, M. Y.; CARUSO, R. et al. (2017). *Gut microbiota: role in pathogen colonization, immune responses and inflammatory disease*. Immunology Review. v.279, p. 1-39.
- RAJILIC-STOJANOVIC, M.; de VOS, W. M. (2014) *The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota*. FEMS Microbiology Review. v. 38, p.996–1047.
- RAUSCH, S.; HELD, J.; FISCHER, A. et al. (2013). *Small intestinal nematode infection of mice is associated with increased enterobacterial loads alongside the intestinal tract*. PLoS ONE. v.8, p.1-13.
- REYNOLDS L. A.; SMITH, K. A.; FILBEY, K. J. et al. (2014). *Commensal-pathogen interactions in the intestinal tract Lactobacilli promote infection with, and are promoted by, helminth parasites*. Gut Microbes. v. 5, p. 522–532.
- RICHARDS-RIOS, P.; FOTHERGILL, J.; BERNARDEAU, M. et al. (2020). *Development of the ileal microbiota in three broiler breeds*. Frontiers in Veterinary Science. v.7, p.1-18.
- RINNINELLA, E.; RAOUL, P.; CINTONI, M. et al. (2019). *What is the healthy gut microbiota composition? A changing ecosystem across age, environment, diet, and diseases*. Microorganisms. v. 7, p. 1-22.

- ROBINO, P.; FERROCINO, I.; ROSSI, G. et al. (2019). *Changes in gut bacterial communities in canaries infected by Macrorhabdus ornithogaster*. Avian Pathology. v.48, p.111-120.
- SHANG, Y., KUMAR, S., OAKLEY, B. et al. (2018). *Chicken gut microbiota: Importance and detection technology*. Frontiers in Veterinary Science. v.5, p. 1-11.
- SHI, Z.; ZOU, J.; ZHANG, Z. et al. (2019). *Segmented filamentous bacteria prevent and cure Rotavirus infection*. Cell. v. 17, p.644-658.
- SHOJADOOST, B.; KULKARNI, R. R.; BRISBIN, J. T. et al. (2017). *Interactions between lactobacilli and chicken macrophages induce antiviral responses against avian influenza virus*. Research in Veterinary Science. v.125, p.441-450.
- SOMMER, F.; MOLTZAU, J. A.; BHARTI, R. et al. (2017). *The resilience of the intestinal microbiota influences health and disease*. Nature Reviews | Microbiology. v.15, p. 630-638.
- SONG, B.; LI, P.; YAN, S. et al. (2022). *Effects of dietary astragaluspolysaccharide supplementation on the Th17/Treg balance and the gut microbiota of broiler chickens challenged with necrotic enteritis*. Frontiers in Immunology. v.13, p.1-27.
- SU, C., SU, L., LI, Y. et al. (2018). *Helminth induced alterations of the gut microbiota exacerbate bacterial colitis*. Mucosal Immunology. v. 11, p.144–157.
- TEIRLYNCK, E.; GUSSEM, M. D. E.; DEWULF, J. et al. (2011). *Morphometric evaluation of ‘dysbacteriosis’ in broilers*. Avian Pathology. v.40, p. 139-144.
- TONG, L.; WANG, W.; REN, S. et al. (2022). *The 16S rRNA gene sequencing of gut microbiota in chickens infected with different virulent Newcastle disease virus strains*. Animals. v. 12, p.1-12.
- WALK, S.T.; BLUM, A. M.; EWING, S. A. S. et al. (2010). *Alteration of the murine gut microbiota during infection with the parasitic helminth Heligmosomoides polygyrus*. Inflammatory bowel disease. v.16, 1841-1849.
- WEI, S.; MORRISON, M.; YU, Z. (2013). *Bacterial census of poultry intestinal microbiome*. Poultry Science. v. 92 , p.671–683.
- WELLS, J. M. (2011). *Immunomodulatory mechanisms of lactobacilli*. Microbial Cell Factories. v.10, p.1-15.

- WICKRAMASURIYA, S. S.; PARK, I.; LEE, K. et al. (2022). *Role of physiology, immunity, microbiota, and infectious diseases in the gut health of poultry*. *Vaccines*. v.10, p. 1-30.
- XI, Y.; Shuling, N.; Kunyuana, T.; Qiuyang, Z.; et al. (2019) *Characteristics of the intestinal flora of specific pathogen free chickens with age*. *Microbial Pathogenesis*, v.132, p.325–334.
- XIAO, Y.; XIANG, Y.; ZHOU, W. et al. (2017). *Microbial community mapping in intestinal tract of broiler chicken*. *Poultry Science*. v. 96, p. 1387–1393.
- YANG, W.Y.; LEE, Y.; LU, H. et al. (2019). *Analysis of gut microbiota and the effect of lauric acid against necrotic enteritis in Clostridium perfringens and Eimeria side-by-side challenge model*. *PLoS ONE*. v. 14, p. 1-22.
- YANG. X.L.; WANG, G.; XIE, J. Y. et al. (2021). *The intestinal microbiome primes host innate immunity against enteric virus systemic infection through type I Interferon*. *mBio*. v. 11, p. 1-20.
- YIN, H. C.; LIU, Z. D.; ZHANG, W. W. (2022). *Chicken intestinal microbiota modulation of resistance to nephropathogenic infectious bronchitis virus infection through IFN-I*. *Microbiome*. v.10, p.1-17.
- YITBAREK, A.; WEESE, J. S.; ALKI, T. N. et al.(2017) *Influenza A virus subtype H9N2 infection disrupts the composition of intestinal microbiota of chickens*. *FEMS Microbiology Ecology*. v. 94, p. 1-10.

CAPÍTULO II

Erosão e síndrome de ulceração do ventrículo (moela)

5. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

5.1. Anatomia do ventrículo

As aves possuem o estômago com duas câmaras, o proventrículo (estômago glandular) e ventrículo (estômago muscular). O ventrículo é um órgão grande e forte, suas paredes musculares são muito densas refletindo a responsabilidade desse órgão para desempenhar a quebra mecânica e trituração dos alimentos. A parede do ventrículo consiste em 4 camadas: a mucosa, onde as glândulas produtoras de cutículas estão agrupadas em grupos de 10 a 30; a submucosa, consistindo de tecido conjuntivo para assegurar uma forte conexão entre a mucosa e os tecidos subjacentes, permitindo assim uma ação de trituração eficaz; a túnica muscular, composta por 2 pares de músculos circulares opostos; e a serosa (Rodrigues e Choct, 2018). A mucosa é recoberta por uma camada sólida de um complexo de carboidrato-proteína denominada membrana coilina. Cerca de 80% do peso da coilina é constituída de proteína, com altos níveis de ácidos glutâmico e aspártico, leucina e arginina (Gjevre et al., 2013). A coilina serve como proteção contra as enzimas ácidas e proteolíticas secretadas pelo proventrículo e contra lesões durante a trituração de alimentos duros. A coilina é secretada pelas glândulas ventriculares e pilóricas, sendo continuamente desgastada e substituída. A região pilórica, com cerca de 0,5 cm de comprimento, conecta o ventrículo ao duodeno e suas glândulas mucosas secretam muco em vez da cutícula (Rodrigues e Choct, 2018).

O ciclo de trituração começa com a contração dos músculos finos, seguida pela abertura do piloro e uma poderosa contração peristáltica no duodeno. O par de músculos espessos se contrai imediatamente após o início da contração duodenal, o que resulta em conteúdo gástrico sendo empurrado para o duodeno e outro conteúdo entrando no proventrículo. À medida que os músculos grossos começam a relaxar, o proventrículo se contrai e retorna o conteúdo para o ventrículo. Este ciclo de contração ocorre até quatro vezes por minuto e tritura o material devido ao atrito contra a camada coilina no interior e contra outras partículas durante a contração dos músculos grandes. Já os músculos pequenos movem o material em direção às zonas de trituração entre as contrações dos grandes músculos (Svihus, 2011).

5.2. Erosão da moela (ventrículo) e síndrome de ulceração

Em 1933, Holst e Halbrook (1933) em um estudo nutricional observaram pontos de erosão na membrana coilina do ventrículo de pintinhos com aptidão ao corte com três semanas de idade. Essa foi a primeira descrição da “erosão da moela e síndrome de ulceração” (GEU, inglês “gizzard erosion and ulceration syndrome”) (Gjevre et al., 2013). Nos anos seguintes as investigações apontaram o papel da alimentação na etiopatogenia da GEU, associada com sulfato de cobre (Fisher et al., 1973), óxido de zinco (Dewar et al., 1982), milho mofado (Beasley et al., 1979), farinha de peixe superaquecida que libera uma substância derivada da histamina (*gizzerosine*) (Okazaki et al., 1983) e deficiência de vitamina B₆ (Daghir e Haddad, 1981). Dentre estas causas de erosão de ventrículo, a infecção pelo Adenovírus aviário (FAV) também foi documentada (Goodwich, 1993).

5.3. Achados anatomopatológicos da GEU

As lesões macroscópicas da GEU são caracterizadas por distensão do ventrículo com fluido hemorrágico e múltiplas erosões irregulares pretas dentro da camada coilina (Fitzgerald, 2020). A “erosão” acomete somente a membrana coilina, enquanto a “úlcera” é mais profunda acometendo a mucosa (Gjevre et al., 2013). Um estudo criou um sistema de pontuação para avaliar as lesões macroscópicas da moela: a dilatação do ventrículo é avaliada anteriormente a abertura do mesmo, e após a abertura, avalia-se o grau da coloração (preto, castanho ou vermelho) do conteúdo do ventrículo. Então, o conteúdo é removido para a inspeção da superfície da membrana coilina. O passo seguinte é a separação da membrana coilina da mucosa do ventrículo, avaliar a presença de material de coloração vermelha ou esponjoso na parte inferior da camada coilina ou na superfície da mucosa. Na superfície da mucosa pode haver depressões (depressões pequenas, mas distintas e sem hemorragia), úlceras (depressões distintas com hemorragia) e perfurações (Kaldhusdal et al., 2012).

As principais lesões microscópicas são caracterizadas por degeneração e necrose da membrana coilina. Degeneração, descamação, atrofia e desaparecimento de células epiteliais glandulares que secretam as substâncias da camada coilina e aumento de macrófagos e heterófilos nas áreas focais da lâmina própria sob as substâncias necróticas da coilina (Ono et al., 2003). Nas lesões moderadas, há focos necróticos extensos na camada de coilina e focos mais extensos de degeneração e depleção de glândulas, bem como acúmulo aumentado de macrófagos e heterófilos na lâmina própria. Nas lesões graves, observa-se exposição completa da mucosa por necrose focal e perda da membrana coilina, além de diminuição acentuada ou

perda de glândulas. As lesões ulceradas são caracterizadas por perda da membrana mucosa que se estende para as camadas musculares além da submucosa. Quando a etiopatogenia da GEU é devido a infecção pelo Adenovírus aviário, ocorrem inclusões intranucleares basofílicas ou eosinofílicas nas células epiteliais glandulares principalmente no interior ou ao redor da área necrótica (Abe et al., 2000).

5.4. Fatores causadores ou predisponentes

5.4.1. Fatores congênitos

Lesões do ventrículo e na membrana coilina foram detectadas em embriões e pintinhos recém nascidos em vários países europeus, indicando que a GEU pode ser congênita, portanto, causada por fatores antes da eclosão como a dieta da matriz reprodutora, idade reprodutiva da matriz e fragilidade capilar combinada por aumento transitório da pressão sanguínea durante a eclosão (Gjevre et al., 2013).

5.4.2. Privação de água e comida

Pesquisadores demonstraram que a privação de água e alimento em aves, com 1, 2, 3, 4 e 8 semanas de idade, induziu erosões do ventrículo. As lesões começaram a aparecer com 2 a 4 dias de privação de ambos e foram caracterizadas por fissuras longitudinais por toda a mucosa, áreas de congestão e ulceração (Bierer et al., 1966). Good et al. (1967) relataram que moelas de pintos de 1 dia de idade com privação do alimento até o terceiro dia pós-eclosão, seguido de acesso à ração, mostraram apenas vestígios de úlceras antigas no dia sétimo dia pós-eclosão. Esse achado sugere que a privação de alimento nos primeiros dias de criação não é a causa da ulceração da moela que persiste após 2 semanas de idade (Good et al., 1967; Gjevre et al., 2013).

5.4.3. Deficiência nutricional

Foi encontrado um aumento significativo de GEU em pintinhos com deficiência de vitamina B₆. Notavelmente, os pintinhos que receberam suplementação de ácido taurocólico a 1% tiveram menos erosão do ventrículo e menor mortalidade. A vitamina B₆ está envolvida na síntese de taurina, sendo um cofator para reações de aminoácidos como glicina, metionina, serina, alanina que são utilizados para a produção de taurina. Os autores sugerem que a deficiência de vitamina pode contribuir para a insuficiência de taurina e presumivelmente também para a insuficiência de ácido taurocólico, que é um ácido biliar (Daghir e Haddad, 1980).

5.4.4. Estresse

Grabarevic et al. (1993) induziram estresse em frangos de três dias de idade através da privação de alimento por 24h, e após isso os pintinhos foram imersos em água corrente (17°C) por cinco segundos. O grupo A foi sacrificado imediatamente antes de ser submetido ao estresse, o grupo B uma hora, o grupo C duas horas e o grupo D três horas após o estresse por imersão em água. As lesões do ventrículo no grupo A foram muito leves e a principal característica foi a descoloração e espessamento do revestimento epitelial do ventrículo. Nos grupos B, C e D as lesões foram mais acentuadas e caracterizadas por erosões do ventrículo, ulcerações e hemorragias especialmente pronunciadas no grupo D. Este modelo produziu lesões em todos os pintinhos estressados (Grabarevic et al., 1993).

5.4.5. Intoxicações

Pesquisadores demonstraram que o excesso do nível de cobre na dieta acima de 250 ppm induziu erosões do ventrículo de pintinhos e a severidade das lesões eram observadas com aumento do nível de cobre (Poupoulis e Jensen, 1975). Outro composto que em altas concentrações induz erosões do ventrículo é o óxido de zinco, que também pode causar lesões de necrose e fibrose no pâncreas e aneurisma dissecante da aorta (Dewar et al., 1983).

Gizerosina é um agente causal da GEU descrito por Okazaki et al. (1983). Este composto causou erosão acentuada do ventrículo em pintinhos em uma semana, quando foram alimentados com 2,2 ppm na dieta. Essa substância é formada pela farinha de peixe integral quando é superaquecida (>130°), sendo produzida pela reação entre a histidina e a proteína da carne do peixe (Okazaki et al., 1983).

Aminas biogênicas são substâncias contendo grupos aminas produzidas por organismos biológicos, como histamina (His), cadaverina, putrescina, espermina e espermidina. São produtos de degradação produzidos durante a descarboxilação do catabolismo de aminoácidos. A His age estimulando a secreção de ácido gástrico das células parietais através dos receptores H₂, e se a His dietética exceder a capacidade de degradação (geralmente em situações de *stress*), pode causar estimulação contínua da secreção de ácido gástrico com subsequente erosão do ventrículo (Kim et al., 2016).

Com relação às micotoxinas, os tricotecenos constituem um grande grupo de micotoxinas de *Fusarium*, incluindo desoxinivalenol (DON) e toxinas T-2 e HT-2 que são frequentemente encontradas em rações e grãos (Gjevre et al., 2013). Erosões do ventrículo

seguida a exposição de diacetoxiscirpenol (2,7mg/kg) já foi documentada (Hoerr et al., 1981). Outra micotoxina pertencente ao grupo tricoteceno e denominada nivalenol (3, 6, 12 ppm), também foi associada com lesões do ventrículo (Hedman et al., 1995). As micotoxinas tricotecenos causam lesões citotóxicas por bloquear a síntese de proteínas pela inibição da peptidil transferase; inibição da síntese de DNA; bloqueia a absorção de fosfatos; interfere na síntese lipídica; e inativa algumas enzimas que possuem grupos tiol no sítio ativo (Hoerr et al., 1981).

Javed et al. (2005) demonstraram que outras micotoxinas estão associadas com lesão do ventrículo. Fumonisina B₁ e B₂, além de moliniformina são produzidas por *Fusarium proliferatum*, que ao serem ingeridas por pintinhos causaram ulcerações da moela destes (Javed et al., 2005).

O ácido ciclopiazônico é uma micotoxina produzida por várias espécies de fungos como *Penicillium* e *Aspergillus*, e em experimentos de alimentação onde as aves receberam 10 ou 34 mg da micotoxina por kg de ração, produziram necrose da mucosa do ventrículo (Gentles et al., 1999; Kamalavenkatesh et al., 2005).

Adenovirus aviário foi relatado associado com erosão e ulceração do ventrículo de pintinhos juntamente com corpúsculo de inclusão intranuclear nas células epiteliais da mucosa (Goodwin et al, 1993). Os adenovírus aviários (FAdV) pertencem à família *Adenoviridae*, gênero *Aviadenovirus*, e são classificados em 5 grupos (A–E) e 12 sorotipos. O adenovírus aviário-1 (espécie A) é o responsável por produzir erosões na moela. É um vírus DNA com estrutura icosaédrica, não envelopada e com 70 a 90 nm de diâmetro. Tanto a transmissão vertical quanto a horizontal são importantes na disseminação do vírus e, conseqüentemente, na indução da doença. Surtos da doença causada pelo FadV têm sido relatados em muitos países como Reino Unido, Polônia (Marek et al., 2010), Japão (Ono et al., 2003), Itália (Manarolla et al., 2009), Coreia do Sul (Lim et al., 2012) e Irã (Mirzazadeh et al., 2021). Os principais sinais clínicos são aves prostradas e inapetentes, resultando em baixo ganho de peso e diminuição da uniformidade do lote (Lim et al., 2012). Os frangos de corte acometidos por essa doença, geralmente não apresentam sinais clínicos e, portanto, o problema é identificado principalmente no abate (Gjevre et al., 2013).

5.5. Métodos de diagnóstico

O diagnóstico definitivo de micotoxicoses requer identificação e quantificação dos compostos específicos. Para análise química, realiza-se a coleta do plasma ou do tecido para

avaliar os teores de zinco e cobre por espectrofotômetro de absorção atômica (Dewar et al., 1993). Para a análise de vitaminas, histamina e outros, utiliza-se a cromatografia líquida de alta eficiência (Kim et al., 2016). No caso de suspeita de micotoxicose, as amostras de ração e ingredientes devidamente coletadas devem ser enviadas a um laboratório de testes de ração para análise. Quando houver suspeita de qualquer toxicidade, os seguintes tecidos devem ser coletados em recipientes limpos, armazenados e congelados até serem testados para micotoxinas e outras toxinas: conteúdo do papo, conteúdo do proventrículo e do ventrículo, fígado, rim, gordura e bile. Os métodos de detecção para micotoxinas incluem cromatografia (camada fina, gás e líquido), espectrometria de massa, cromatografia de fluxo lateral, testes fluorométricos quantitativos e tecnologia de ensaio imunoenzimático competitivo direto (ELISA). A análise simultânea de múltiplas micotoxinas é obtida por cromatografia líquida com espectrometria de massa em *tandem* (Fitzgerald., 2020).

Os FAdV são diagnosticados por isolamento viral em ovos de galinha embrionados ou cultura de células, por microscopia eletrônica ou por PCR. O uso de PCR seguido de sequenciamento permite a diferenciação de isolados de campo para espécies e sorotipos presumíveis (Lim et al., 2012). A detecção de DNA de adenovírus em amostras de tecido pode ser realizada por hibridização *in situ* (ISH) ou também por imuno-histoquímica (IHQ). A histopatologia do tecido e a demonstração de inclusões basofílicas intranucleares fornecem uma indicação da presença do vírus e doença (Fitzgerald, 2020).

O presente estudo foi realizado com o objetivo de investigar a causa do atraso no crescimento em pintinhos de corte de sete dias de idade com lesões de moela, além das consequências para a microbiota ileal.

5.6. Material métodos

5.6.1. Amostras e histologia

Foram amostrados 22 pintinhos com sete dias de idade, provenientes de uma granja comercial do estado do Rio de Janeiro. Os pintinhos foram selecionados devido ao histórico de diminuição de consumo de ração no quarto dia de idade, diarreia aquosa, diminuição no ganho de peso, desuniformidade do lote e aumento leve da mortalidade. A suspeita era de enterite viral como causa do atraso no crescimento e refugagem. No Setor de Patologia Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), cada pintinho foi pesado individualmente na mesma balança digital e eutanasiado por deslocamento cervical de acordo

com as orientações sobre eutanásia Resolução 1000/2012 do Conselho Federal de a Medicina Veterinária.

O exame *post mortem* completo foi realizado em todos os pintinhos e as alterações macroscópicas foram registradas. Duodeno, jejuno, íleo, baço, timo, bolsa cloacal, fígado, pulmão, coração, rim, ventrículo, proventrículo, pâncreas, tonsilas cecais e ceco foram coletados e fixados por 48 horas em formol neutro tamponado a 10%. Os intestinos e os ventrículos foram coletados e armazenados a -80°C até seu processamento.

Os tecidos fixados foram incluídos em parafina de baixa fusão e cortes de 4 µm de espessura foram obtidos. Os cortes foram corados com hematoxilina-eosina (HE) seguindo procedimentos de rotina e analisados em microscópio de luz comum (Luna, 1968).

5.6.2. PCR convencional do ventrículo

O DNA total da mucosa do ventrículo foi extraído utilizando um kit comercial (DNeasy Blood & Tissue Kit, Qiagen Inc., Toronto, Ontário), seguindo as recomendações do fabricante. Todas as amplificações foram realizadas em um termociclador (MaxyGene®, Axygen, Union City, Califórnia, EUA) de acordo com protocolos previamente descritos (Meulemans et al., 2001). Os oligonucleotídeos (primer) foram obtidos da Thermo Fisher Scientific (São Paulo, Brasil). Para detectar o DNA FAdV do Aviadenovirus, os primers A 5'-CAARTTCAGRCAGACGGT-3' e B 5'-TAGTGATGMCGSGACATCAT-3' foram usados para amplificar uma sequência conservada adjacente ao loop L1 do gene da proteína hexon (Meulemans et al., 2001).

5.6.3. Sequenciamento de alto rendimento

5.6.3.1. Extração do DNA

As amostras intestinais do segmento do íleo estavam armazenadas em ultrafreezer -80°C até seu processamento. Inicialmente foi realizado pré tratamento para lise da parede celular de bactérias gram positivas, o qual consistia em um mix com os seguintes reagentes: DTT (10% de DTT em PBS pH 7.2); solução de TrisHCl 200mM; solução de EDTA 20mM; Triton X100; solução de lisozima (100mg/mL em PBS, pH7.2). Além disso, foram utilizadas 0,3 g por amostra de beads de zircônio 0,1mm. A homogeneização da amostra foi realizada no TissueLyser LT durante 10 minutos em velocidade máxima. Em seguida, foi utilizado um kit comercial (DNeasy Blood & Tissue Kit, Qiagen Inc., Toronto, Ontário), seguindo as

recomendações do fabricante. O DNA foi quantificado e a purificação foi determinada pelo espectrofotômetro NanoDrop® 2000/2000c (ThermoFisher Scientific, USA).

5.6.3.2. Sequenciamento genômico

Para a reação em cadeia da polimerase (PCR) inicial, foram utilizados oligonucleotídeos conforme protocolo da Illumina para MiSeq. Combinações de oligonucleotídeos para a PCR do 16S

Amplicon	Forward	Primer	=
5'TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG			e
16S	Reverse	Primer	=
	5'GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC		

visando as regiões hipervariáveis V3-V4 do gene 16S rRNA. Para a realização da PCR para a amplificação do 16S rRNA foi utilizado Platinum™ Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen). Os ciclos utilizados foram 1 ciclo de desnaturação inicial a 94 ° C por 3 min, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 94 ° C por 15 segundos, anelamento a 58 ° C por 30 segundos e extensão a 68 ° C durante 1 min, extensão final a 68°C por 7 minutos.

Posteriormente, os produtos da PCR foram purificados usando esferas Agencourt AMPure (Beckman Coulter, Indianapolis, IN). Os amplicons purificados foram amplificados com pares únicos de *i5 forward index i7 reverse index* fornecidos pelo kit Nextera XT Index (Illumina, San Diego, CA, EUA). Cada conjunto de PCRs incluiu extração e PCR em branco. Ambos [i5] e [i7] são as sequências de 10 pb de códigos de barras únicos, que permitiram que as bibliotecas agrupadas fossem sequenciadas simultaneamente, conhecido como multiplexação de amostra. Os amplicons com índice em código de barras foram purificados usando esferas Agencourt AMPure (Beckman Coulter, Indianapolis, IN) e quantificados utilizando Fluorômetro Qubit®2.0 e Qubit™ dsDNA HS and BR Assay Kits (Thermo Fisher Scientific, EUA). Quantidades iguais de cada amplicon purificado contendo código de barras foram reunidas para construir bibliotecas. As bibliotecas foram sequenciadas na plataforma Illumina MiSeq usando o protocolo *paired-end 2 × 300 bp* MiSeq Reagent Kit v3 (600-cycle) (Illumina, San Diego, CA, EUA).

5.6.3.3. Análise de bioinformática e estatística

5.7. Os dados brutos da sequência foram analisados usando o pipeline QIIME 2 (<https://qiime2.org/>) (versão 2020.6) e o pacote phyloseq R (<https://joey711.github.io/phyloseq/>)³⁷. Os dados brutos da sequência foram removidos usando DADA2 no pacote QIIME 238. Os arquivos FASTQ de extremidade emparelhada foram

processados por filtragem de qualidade (average score of <20) baseada em pontuação de qualidade Phred, fusão das extremidades emparelhadas, remoção de quimera, remoção de singleton e construção de uma tabela de recursos que consiste em variantes de sequência amplicon (ASV). Usando o método DADA2 denoise-single, regiões de baixa qualidade das sequências foram removidas e definida a opção de sequência truncada para 260. Todos os ASV foram alinhados pelo MAFFT por meio do alinhamento q2 e a análise filogenética foi realizada usando Fasttree2. Um classificador de taxonomia de aprendizado de máquina scikitlearn naïve Bayes contra as sequências de referência SILVA 138 SSU (SILVA rRNA database project, <https://www.arb-silva.de/> 16S rRNA RefSeq Versão 15.1 foi treinado com o plugin q2-feature-classifier usando as regiões V3V4 de sequências 16S rRNA. A taxonomia foi atribuída a cada ASV usando o comando ‘classifysklearn’ no q2-feature-classifier. Usando a árvore filogenética enraizada construída, foram realizadas análises de diversidade usando o plugin de diversidade dentro do pacote QIIME 2. A diversidade alfa e diversidade beta foram calculadas entre os grupos usando o teste Mann-Whitney e a análise de variância multivariada permutacional (PERMANOVA), respectivamente. DESeq2 foi usado para identificar filotipos diferencialmente abundantes com o valor P ajustado (padj) $\geq 0,05$ para testes múltiplos usando o método Benjamini-Hochberg.

5.8. Resultados

5.8.1. Histórico e sinais clínicos

Os pintinhos eram da linhagem Ross 308 e pertenciam a dois lotes, um com 10.880 mil e outro com 25.120 mil pintinhos. Os galpões eram de pressão positiva, a cama era reutilizada (três vezes) e estava em condições inadequadas. A ração era peletizada (triturada previamente ao fornecimento), sendo a energia metabolizável entre 2.920-2.950 kcal, com o teor de 23% de proteína bruta (sem farinha de carne). Próbíóticos não foram utilizados. O bebedouro era do tipo automático com boa regulagem e fornecimento de água *ad libitum*. As matrizes do lote investigado tinham 50 semanas. As aves foram vacinadas contra a doença de NewCastle, Marek, Gumboro e bronquite infecciosa das galinhas.

Os pintinhos começaram a diminuir o consumo de ração no quarto dia de idade, apresentaram diarreia aquosa ou excreta com ração má digerida e se agrupavam aparentando estar com desconforto ambiental (Fig.1, Fig. 2b). No sexto e sétimo dia do lote foi notada queda no desempenho, atraso no crescimento e desuniformidade (cerca de 50%) (Fig.2a), com

aumento leve da mortalidade. Não houve diferença da média dos pesos entre os grupos de pintinhos com erosão e sem erosão.

5.8.2. Achados macroscópicos e histopatologia

Macroscopicamente, dos 22 pintinhos refugos que apresentaram sinais clínicos, em dezesseis havia lesões no ventrículo. Foram visualizadas múltiplas áreas de depressão e fissuras da membrana coilina, caracterizadas como áreas de erosões (Fig.4). Os intestinos dessas aves estavam frequentemente distendidos por gases e continham conteúdo aquoso com alimento não digerido (Fig.3). Nenhuma lesão macroscópica foi observada em outros órgãos.

Na histopatologia, havia degeneração e perda da camada coilina (Fig.5), em algumas áreas havia restos de células e infiltrado inflamatório constituído principalmente por heterófilos, além de hemorragia (Fig.6). Na camada da mucosa, heterófilos, linfócitos e fibrina foram observados em quantidade discreta na lâmina própria (Fig.7). Não foram encontrados corpúsculos de inclusão intranucleares na mucosa do ventrículo e não havia alterações histológicas nos intestinos.



Figura 1: Pintinhos agrupados aparentando estar com desconforto ambiental



Figura 2: **(A)** Há desuniformidade entre os pintinhos de 7 dias de idade, todos com atraso no crescimento, sendo o do meio mais acentuado em comparação aos outros. **(B)** Excretas úmidas com ração má digerida

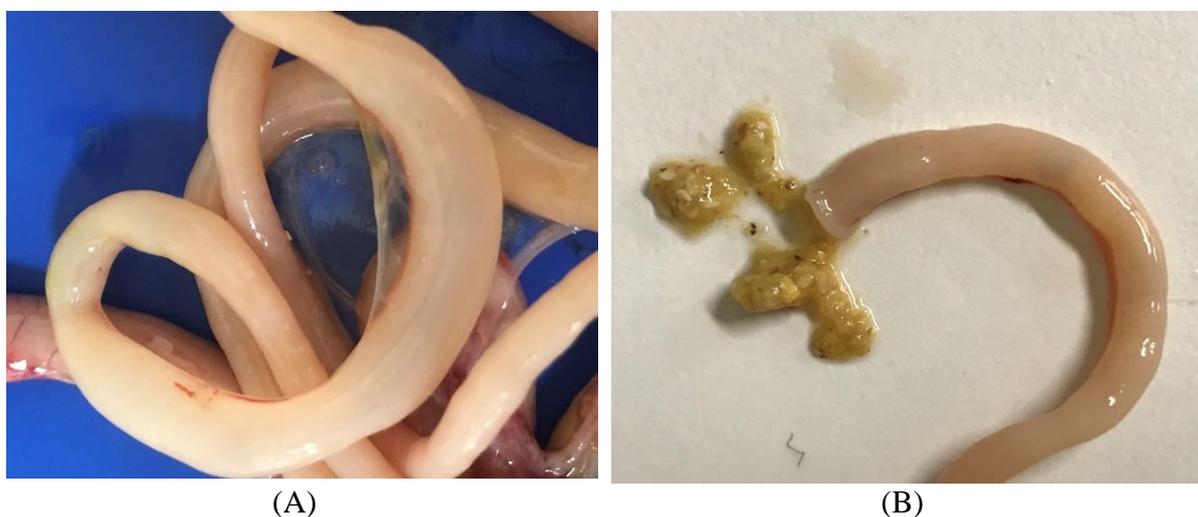
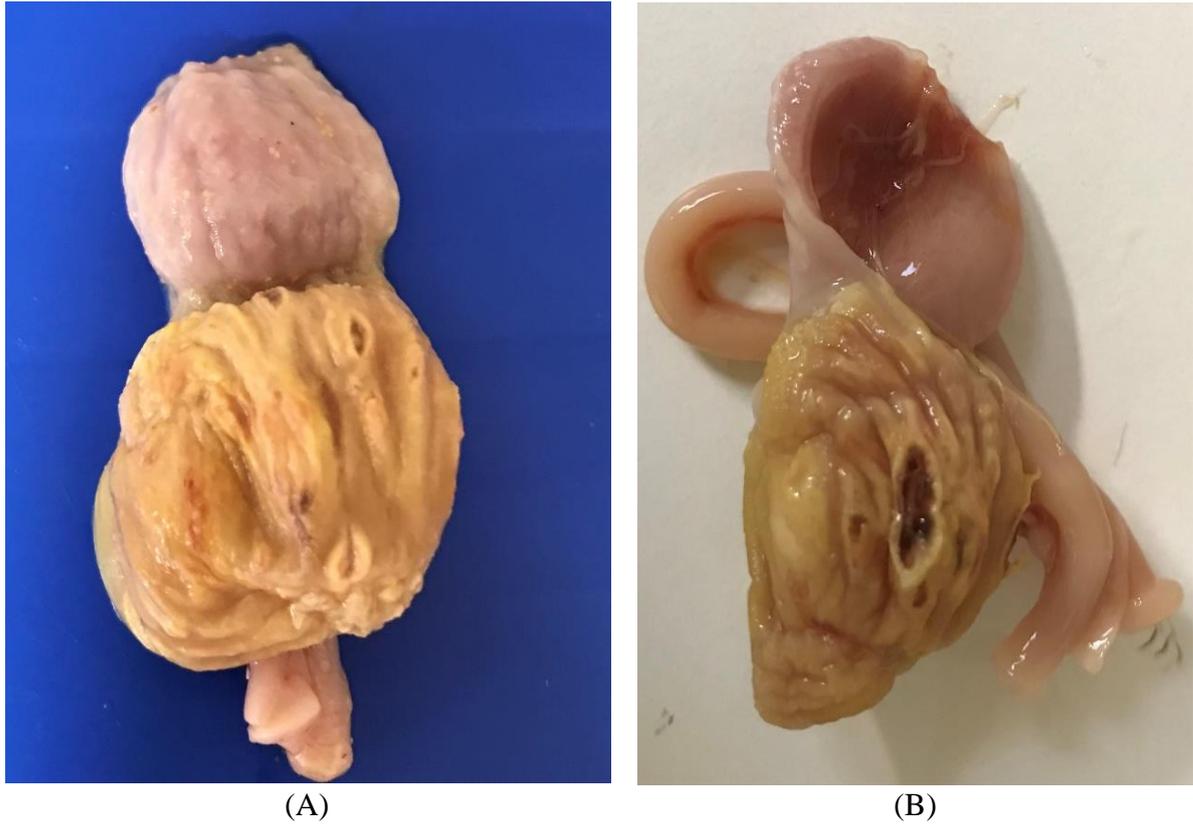


Figura 3: Intestino delgado, pintinho de 7 dias de idade. **(A)** O intestino está mais pálido que o normal, distendido por gases e com conteúdo aquoso. **(B)** Íleo. Alimento mal digerido no lúmen.



(A) (B)

Figura 4: Ventrículo, pintinho de 7 dias de idade. **(A)** Na membrana coilina há áreas multifocais deprimidas redondas a ovaladas de bordas elevadas (erosão) e área de hemorragia discreta. **(B)** Erosão na membrana coilina acentuada com centro marrom.

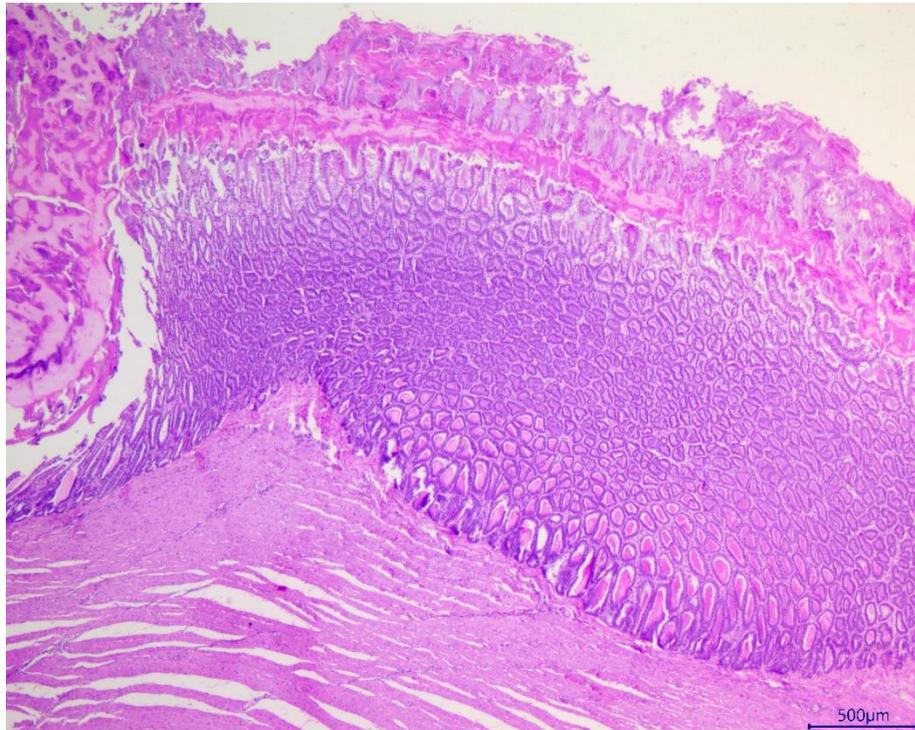


Figura 5: Ventrículo, pintinhos de 7 dias de idade. Degeneração e perda da membrana coilina. Hematoxilina e eosina (HE). Bar = 500 μ m.

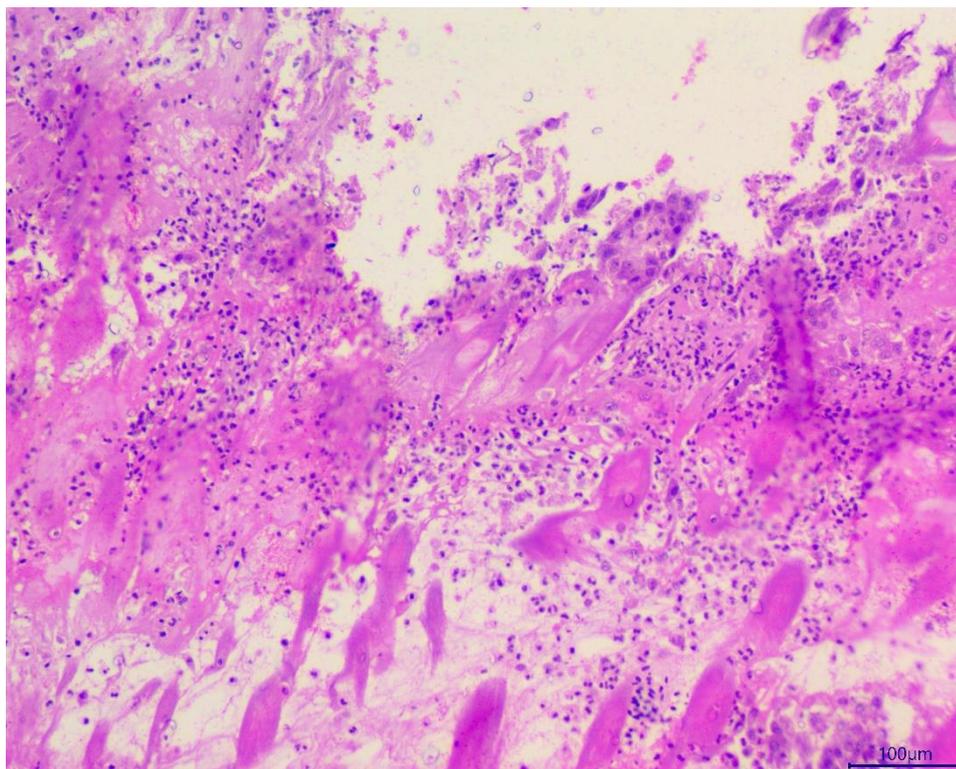


Figura 6: Ventrículo, pintinhos de 7 dias de idade. Degeneração e perda da membrana coilina com restos celulares. Hematoxilina e eosina (HE). Bar = 100µm.

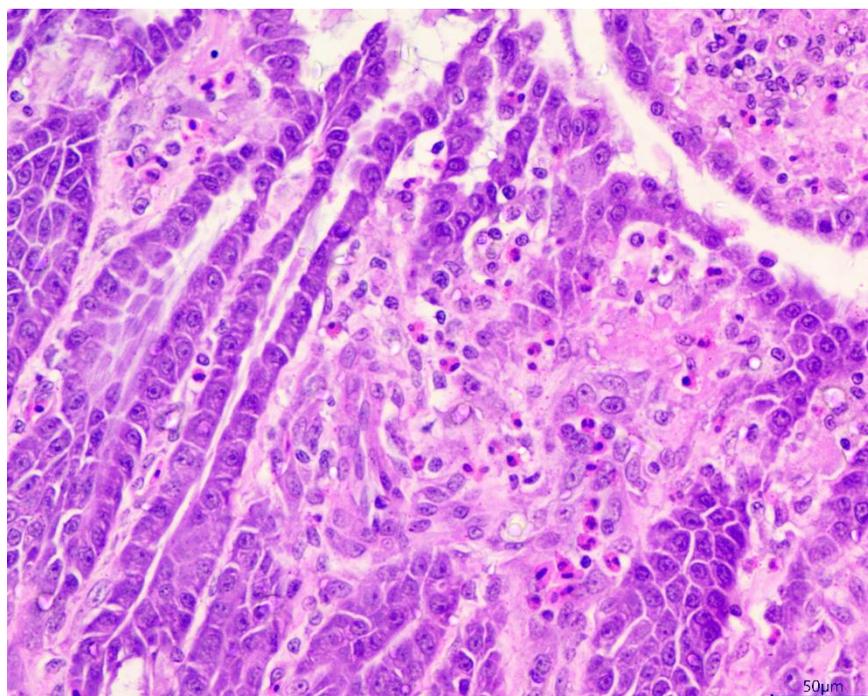


Figura 7: Ventrículo, pintinhos de 7 dias de idade. Na camada da mucosa, na lâmina própria, há heterófilos, linfócitos e fibrina com foco de perda epitelial e fibroplasia discreta. Hematoxilina e eosina (HE). Bar = 50µm.

5.8.2.1. Dados do sequenciamento

Um total de 1.048.972 reads brutas foram obtidas por sequenciamento do conteúdo e mucosa do íleo dos pintinhos de sete dias de idade. Após montagem e filtragem de qualidade, um total de 509.138 leituras passaram pelos filtros aplicados ao QIIME, com um valor médio de 23.142 leituras/amostra, e um comprimento de sequência de 300 pb. A curva de rarefação gerada a partir das OTUs sugeriram que houve uma alta cobertura amostral, portanto as amostras sequenciadas alcançaram a profundidade necessária para observar todos os táxons e, assim, inferir a diversidade total de uma comunidade amostrada. Usando os índices ACE, Chao1, não houve diferença na riqueza e distribuição das espécies, mas nos testes de Shannon e Simpson houve um aumento da diversidade das espécies na microbiota dos pintinhos com erosão do ventrículo (Fig 8), mas não houve diferença estatística ($p > 0,05$) entre a diversidade dos grupos com e sem erosão.

A diversidade beta foi gerada medindo as distâncias de Bray-Curtis entre os grupos de pintinhos com e sem erosão do ventrículo. Na análise com Adonis baseada na matriz de distância Weighted UniFrac não houve diferença estatística significativa entre os grupos sem erosão e com erosão ($R^2 = 0.02065$, $P = 0.964$). Com base na ordenação da matriz de distância gerada usando o algoritmo complementar de Bray-Curtis, a PCoA mostrou que as amostras com erosão não estavam separadas das amostras sem erosão (Fig. 9).

5.8.2.2. Composição taxonômica das bactérias

A composição dos filos da microbiota entre os grupos foi similar, o mais abundante foi Firmicutes (91%) seguido de Bacteroidota (Fig.10). A abundância em nível de gêneros foi dominada por *Lactobacillus* (64%) e *Enterococcus* em ambos os grupos (Fig.11). Não houve diferença significativa ($P > 0.05$) na abundância relativa dos táxons das amostras com erosão de ventrículo e sem erosão de ventrículo. O mapa de calor (*Heatmap*) exibiu a abundância relativa de táxons bacterianos dos grupos de pintinhos com erosão e sem erosão do ventrículo (Fig. 12).

5.9. Discussão

A investigação diagnóstica sobre causa de atraso no crescimento e refugagem necessita primeiramente de exames macroscópicos e microscópicos. A histopatologia dos intestinos possibilita excluir ou não o diagnóstico de enterite viral (de Oliveira et al., 2021), a qual era a suspeita clínica inicial, não confirmada após o exame histopatológico nos pintinhos do presente estudo. Os achados de erosões de ventrículo em várias dessas aves, juntamente com conteúdo

intestinal mal digerido, levantaram questões sobre a causa da lesão na moela e se nessas aves ocorreu alteração na microbiota intestinal (íleo) em comparação às aves sem erosões na moela. Considerando causas infecciosas para a erosão e ulceração da moela, corpúsculos de inclusões intranucleares que indicassem a possibilidade etiológica de adenovírus (Goodwin et al., 1993) não foram encontrados. A PCR do ventrículo dessas aves também resultou negativa para adenovírus. Dessa forma, outras causas para as lesões na moela dessas aves devem ser consideradas com a avaliação conjunta de informações epidemiológicas, ambiência e alimentação dessas aves (Hoerr et al., 1981).

Baseado no ambiente no qual essas aves estavam instaladas, havia desconforto ambiental. Por isso, levantou-se a possibilidade de estresse como responsável pelo baixo desempenho e sinais clínicos observados. Similar a relatos anteriores que identificaram situações de desconforto ambiental (Souza et al., 2016; Shi et al., 2019; Han et al., 2021), a diminuição no consumo de ração e a diminuição no ganho de peso foram os principais sinais clínicos apresentados.

O estresse ocorre como resultado de uma resposta biológica a um estímulo interno ou externo que representa uma ameaça ao equilíbrio fisiológico normal de um organismo. As concentrações plasmáticas de corticosterona são elevadas por estressores devido ao aumento da secreção do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e do hormônio liberador de corticotropina (Scanes, 2016). A produção comercial de aves enfrenta uma variedade de estresses, incluindo o ambiental, nutricional e interno, que diminuem a produção e o desempenho reprodutivo e prejudicam o estado de saúde das aves (Akinyemi e Adewole, 2021). As aves podem sofrer vários estressores ambientais, como estresse por calor (Beuving e Vonder, 1978), estresse por frio (Beuving e Vonder, 1978), restrição alimentar (De Jong et al., 2002), densidade de criação (Mirfendereski e Jahanian, 2015) e altas concentrações de amônia e poeira (Homidan et al., 2003). As manifestações comportamentais de estresse em aves de produção varia conforme a origem do estresse ambiental, podendo apresentar aumento ou diminuição do consumo de ração, menor digestibilidade dos nutrientes, redução do peso corporal individual, e da eficiência alimentar, piora da conversão alimentar, os pintinhos se amontoam, diminuem a atividade locomotora, a ave fica em decúbito ou deitada lateralmente, e há aumento da mortalidade, entre outros (Branco et al., 2021; Akinyemi e Adewole, 2021). No presente estudo, os pintinhos apresentaram comportamentos de desconforto ambiental e consequente diminuição do consumo de ração e atraso do crescimento.

Há pesquisas demonstrando a ocorrência de erosão do ventrículo induzida por estresse (Grabarevic et al., 1993; Dzaja et al., 1996; Grabarevic et al., 1999). No estresse, níveis elevados de acetilcolina e histamina resultam em aumento da produção de ácido gástrico e conseqüentemente erosão na membrana coelina do ventrículo (Grabarevic et al., 1999; Megha et al., 2022). Foi constatado experimentalmente que a erosão do ventrículo foi cerca de 10 vezes mais severa em animais estressados, do que em aves que receberam altas concentrações de histamina (Dzaja et al., 1996). O diagnóstico diferencial da erosão do ventrículo em aves inclui também outras causas não infecciosas como deficiência de vitamina B₆ (Daghir e Haddad, 1980), intoxicação com gizerosina (Okazaki et al., 1983), histamina (Kim et al., 2016) e micotoxinas (Hoerr et al., 1981). No presente estudo, a ração não continha nenhum derivado da farinha de peixe, descartando-se, portanto, a toxicidade por gizerosina. Não foi possível realizar a análise da ração para verificar a presença de micotoxinas, uma causa que não deve ser desconsiderada no diagnóstico diferencial de erosão e ulceração da moela em pintinhos.

No presente estudo, a avaliação da microbiota do íleo por sequenciamento metagenômico revelou aumento da diversidade alfa nos pintinhos com erosão do ventrículo, em comparação aos pintinhos sem erosão no ventrículo. A investigação da microbiota intestinal de aves submetidas ao estresse vem sendo constantemente estudada e há uma variação nos resultados das alterações dessa comunidade. A avaliação da microbiota cecal de frangos de corte submetidos ao estresse pela alta concentração de amônia a 35ppm revelou alteração na diversidade beta e não alterou a diversidade alfa. A alteração na composição da microbiota foi detectada pelo aumento do filo Proteobacteria e gênero *Escherichia-coli* em relação ao grupo controle (Han et al., 2021). O estresse induzido pelo aumento da densidade de aves não alterou a diversidade alfa e beta que se manteve a mesma do grupo controle, porém a composição da microbiota do íleo teve uma diminuição do gênero *Lactobacillus*, *Enterococcus* e *Streptococcus* (Li et al., 2022). O estresse térmico representa uma ameaça aguda à homeostase e tem efeitos adversos potenciais na saúde geral, desempenho de crescimento, fisiologia, imunidade e morfologia intestinal em aves. A investigação da microbiota cecal de frangos de corte submetido ao estresse térmico revelou alteração na diversidade beta e alteração na composição da microbiota cecal com diminuição dos gêneros *Bacteroides*, *Oscillospira*, *Faecalibacterium* e *Dorea* (Shi et al., 2019). A diversidade da microbiota intestinal é importante para promover estabilidade e desempenho. O aumento da diversidade alfa da microbiota tem sido utilizado como um indicador para avaliação da saúde intestinal (Clarke et al., 2014). No presente estudo, a diferença encontrada nos grupos foi um aumento dos índices de Shannon e Simpson da

diversidade alfa dos pintinhos com erosão de ventrículo, sendo um resultado contrário ao descrito em outros-estudos. Não foi investigada a microbiota intestinal do ceco, e devido a sua função e grande diversidade microbiana, poderia fornecer resultados diferentes do íleo sobre alterações da microbiota intestinal. Mais estudos precisam ser realizados com pintinhos sem nenhum sinal clínico de estresse para caracterizar melhor a microbiota intestinal e as possíveis alterações que podem ocorrer como consequência de erosão e ulceração do ventrículo.

5.10. Conclusão

Nesse estudo, foram evidenciados os sinais clínicos e as lesões do ventrículo em pintinhos, possivelmente causados pelo estresse ambiental e/ou micotoxinas, mas sem relação com causa viral. A erosão do ventrículo tem múltiplas causas, por isso ressalta-se a importância dos exames complementares para o diagnóstico definitivo. Além disso, a observação do comportamento do lote é fundamental para esclarecer alterações ambientais que perturbam o bem-estar dos pintinhos. A investigação da microbiota do íleo, dos pintinhos com erosão do ventrículo, não evidenciou alterações na diversidade e na composição da população bacteriana. Mais estudos devem ser realizados para esclarecer se a erosão do ventrículo e consequentemente a má digestibilidade da ração causam alterações significativas e importantes da microbiota intestinal.

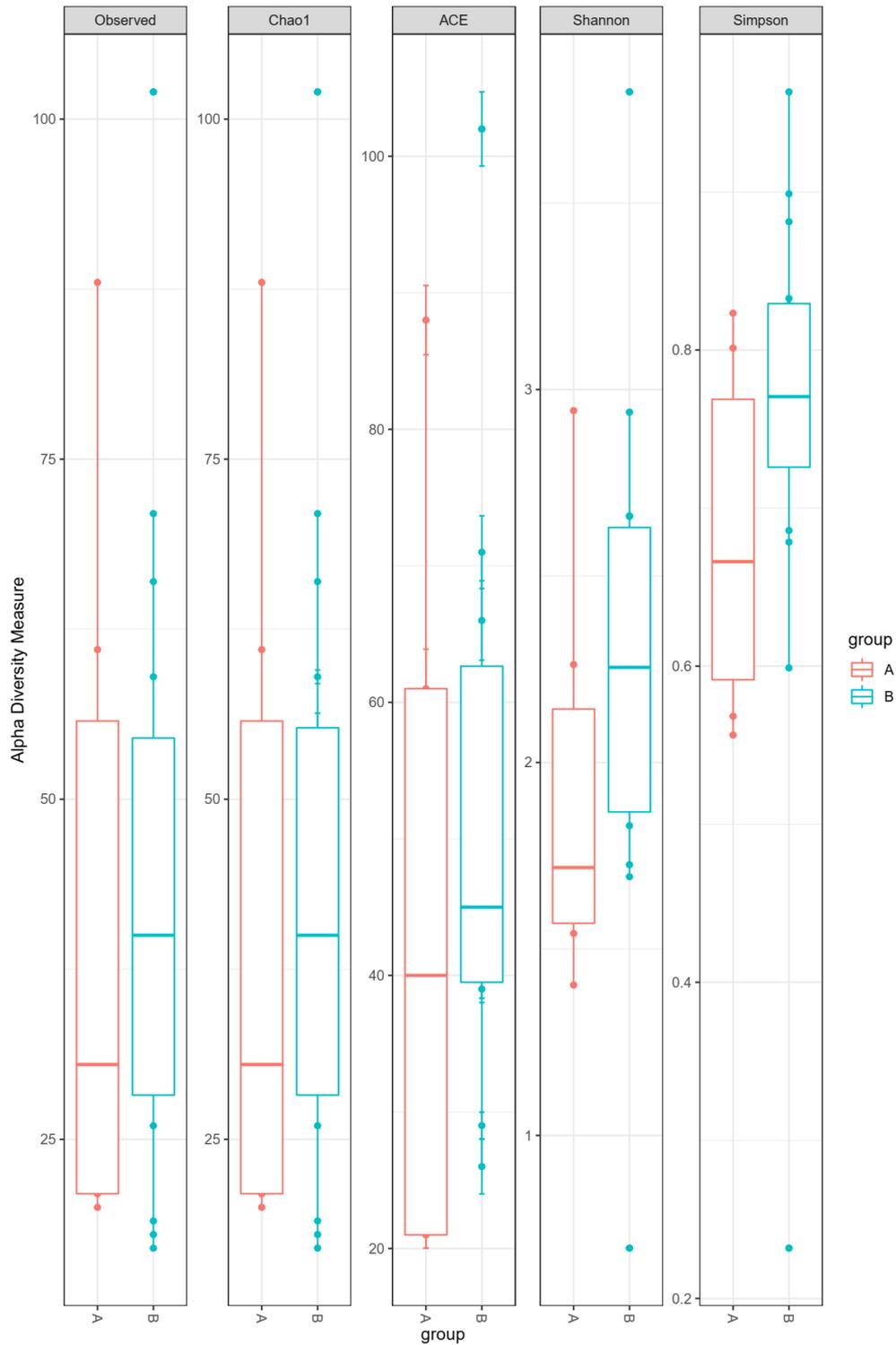


Figura 8: Gráfico de diversidade alfa, sendo (A) pintinhos sem erosão de ventrículo (B) pintinhos com erosão de ventrículo. Gráfico de riqueza de espécies identificadas (observed) e medidas de diversidade alfa: Chao1, ACE (Estimador de riqueza de espécies), testes de Shannon e Simpson (índices de diversidade das espécies). Somente no teste de Shannon e Simpson houve diferença com maior diversidade do grupo com erosão de ventrículo. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos usando os testes de Mann Whitney ($P > 0,05$).

PCoA: Bray-Curtis

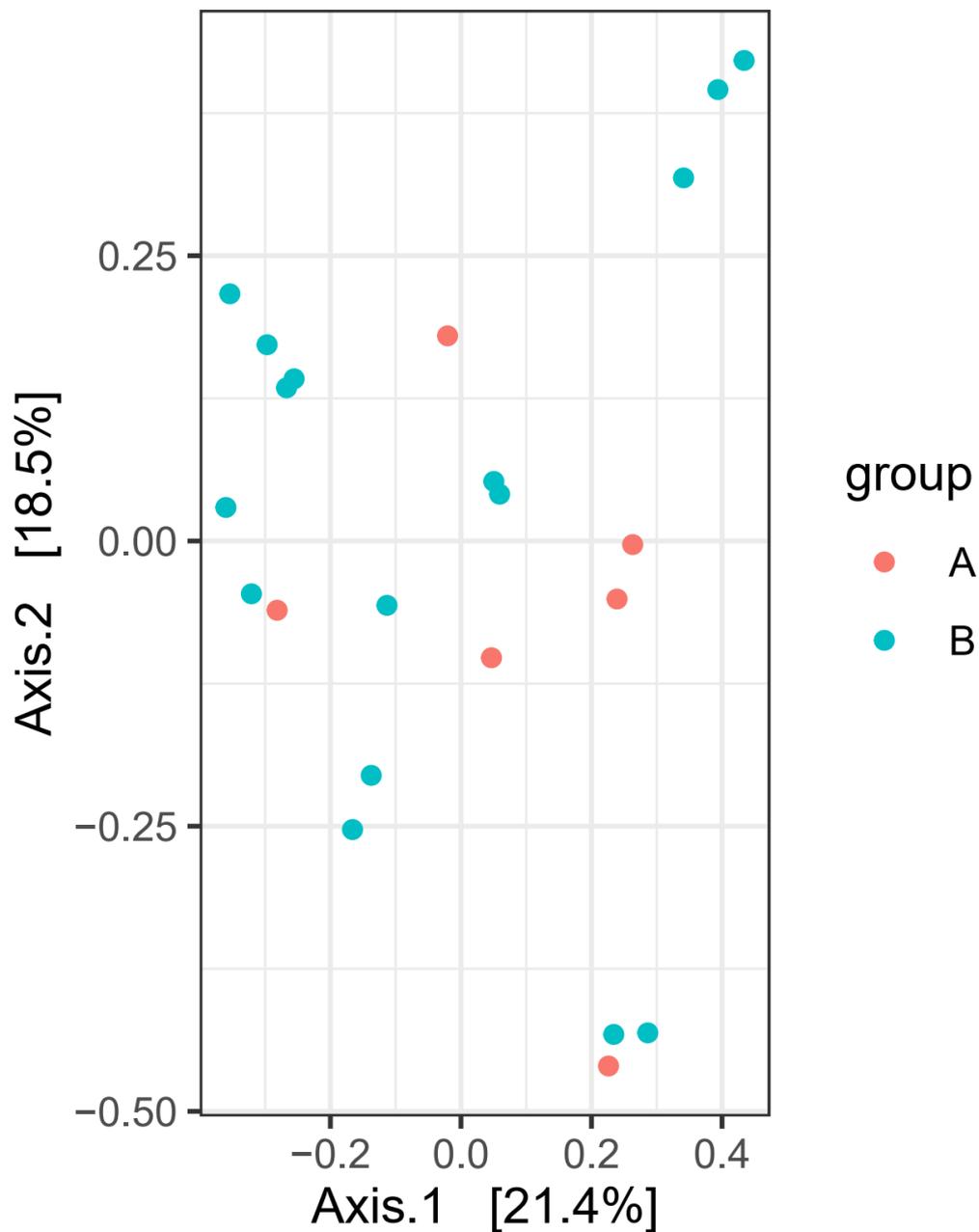


Figura 9: Análise de coordenadas principais UniFrac ponderado. (A) pintinhos sem erosão de ventrículo (B) pintinhos com erosão de ventrículo. Cada ponto representa uma amostra. Se as amostras pertencentes ao mesmo grupo estiverem mais próximas umas das outras, e a distância entre pontos em grupos diferentes for maior, o modelo de classificação é bom. Nesse caso, não houve formação de um cluster.

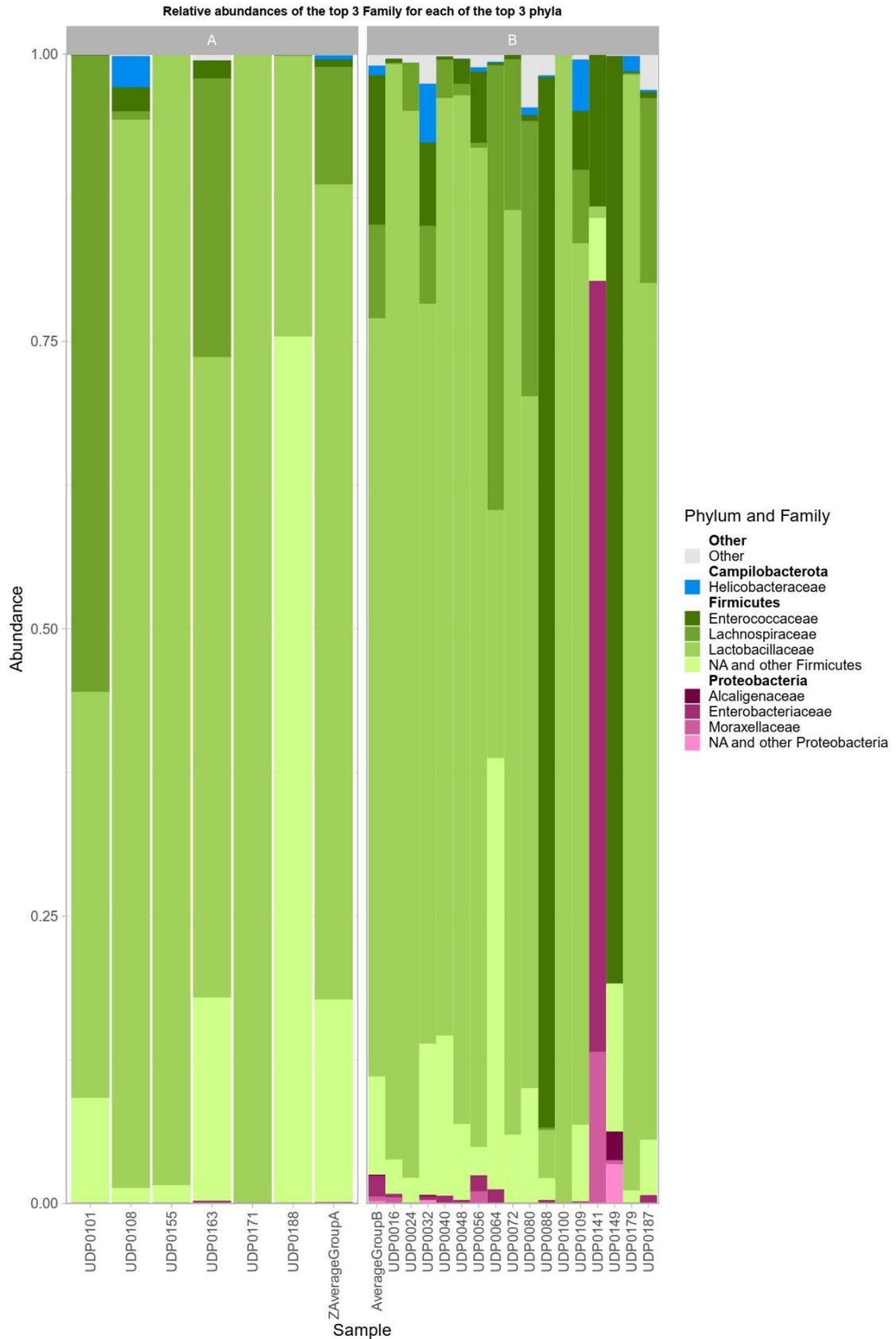


Figura 10: Gráfico de barra empilhado com a abundância dos principais filos e famílias presente no óleo de pintinhos de 7 dias de idade. Grupo A (sem erosão de ventrículo) e grupo B (com erosão de ventrículo).

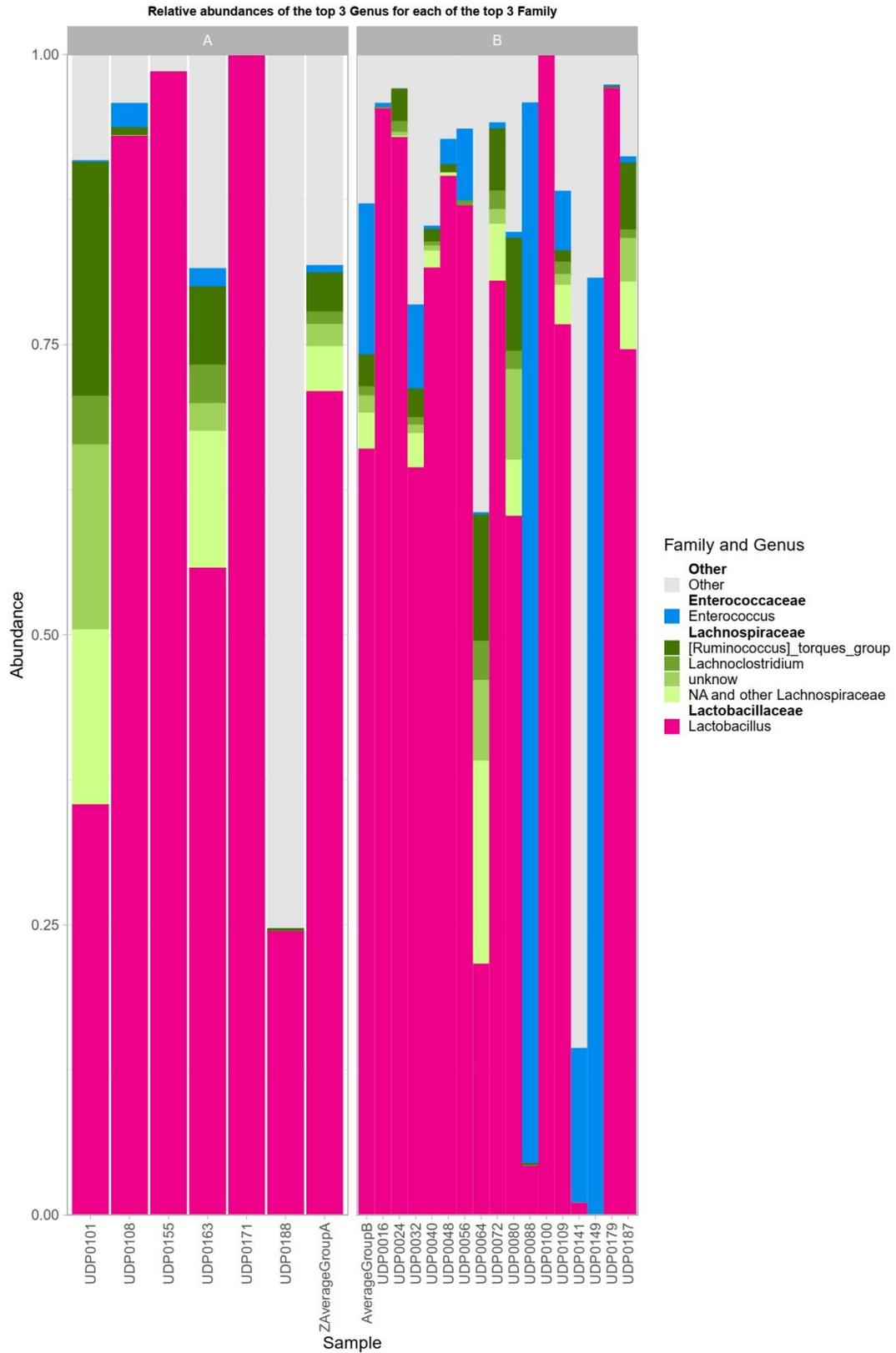


Figura 11: Gráfico de barra empilhado da abundância dos principais gêneros presente no óleo de pintinhos de 7 dias de idade, grupo A (sem erosão de ventrículo) e grupo B (com erosão de ventrículo)

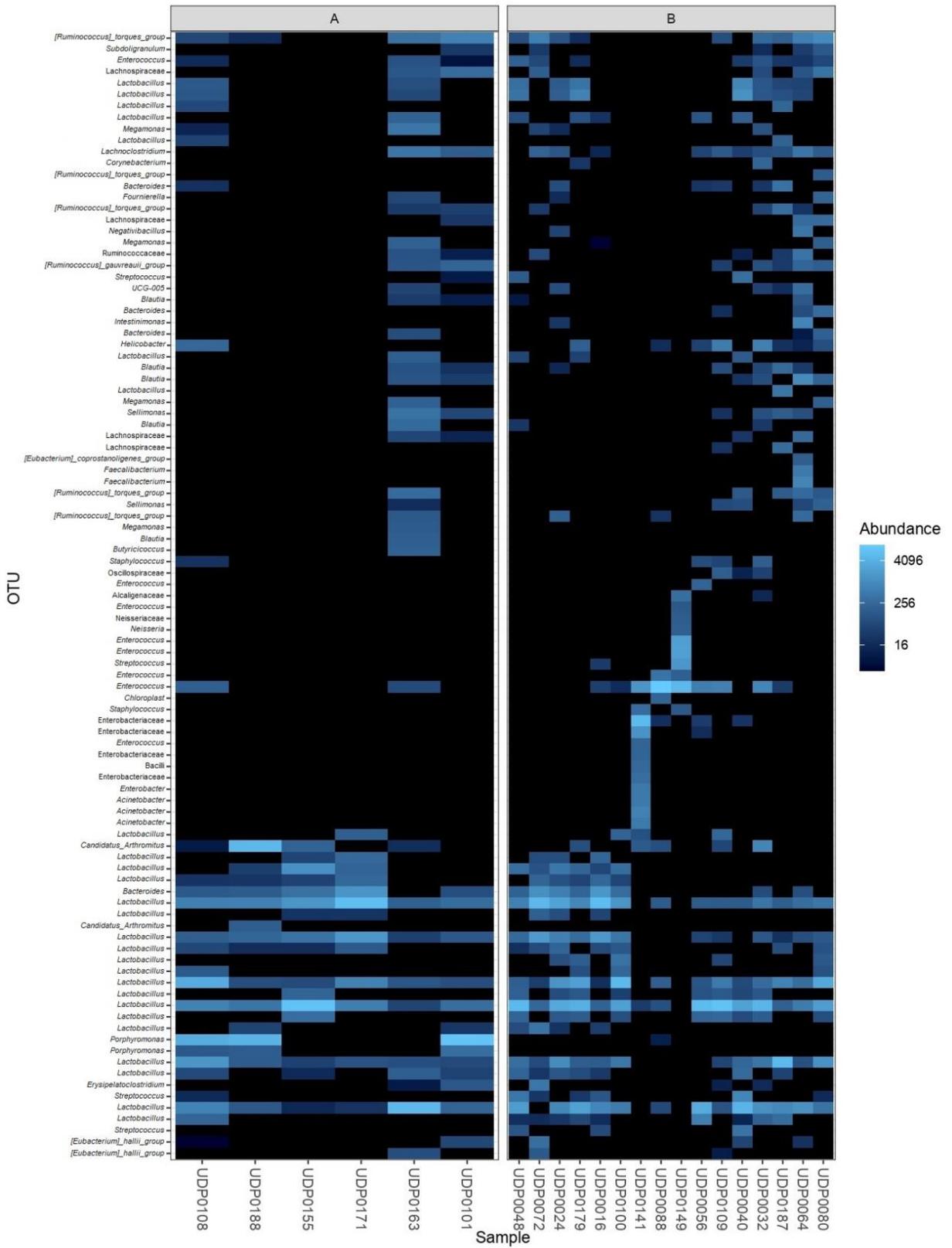


Figura 12: Heatmap demonstrando a abundância dos gêneros no fêo dos pintinhos de 7 dias de idade. O grupo A sem erosão de ventrículo e o B com erosão de ventrículo.

5.11. Referências

- ABE, T.; NAKAMURA, K.; TOJO, T. et al. (2001). *Gizzard erosion in broiler chicks by Group I Avian Adenovirus*. Avian Diseases, v. 45, p. 234-239.
- AKINYEMI, F.; ADEWOLE, D. *Environmental Stress in chickens and the potential effectiveness of dietary vitamin supplementation*. Frontiers in Animal Science. v.2, p.1-21.
- BEASLEY, J. N.; BLALOCK, L. D.; NELSON, T. S. et al. (1979). *The Effect of Feeding Corn Molded with Penicillium lanosum to Broiler Chicks*. Poultry Science. v. 59, p.708-713.
- BEUVING, G.; VONDER, G. M. A. (1978). *Effect of stressing factors on corticosterone levels in the plasma of laying hens*. General and Comparative Endocrinology. v.35, p.153–159.
- BIERER, B. W.; CARLL, W. T.; ELEAZER, T. H. et al. (1966). *Gizzard erosion and lower intestinal congestion and ulceration due to feed and water deprivation in chickens of various ages*. Poultry Science. v.45, p.1408-11.
- BRANCO, T.; MOURA, D. J.; NÄÄS, I. A. et al. (2021). *The sequential behavior pattern analysis of broiler chickens exposed to heat stress*. AgriEngineering. v. 3, p.447–457.
- CLARKE, S. F.; MURPHY, E. F.; O’SULLIVAN, O. et al. (2014). *Exercise and associated dietary extremes impact on gut microbial diversity*. Gut. v.63, p.1913–1920.
- DAGHIR, N. J.; HADDAD, K. S. (1980). *Vitamin B6 in the etiology of gizzard erosion in growing chickens*. Poultry Science. v. 60, p.988-992.
- de JONG, I. C.; VAN VOORST, S., EHLHARDT, D. A. et al. (2002). *Effects of restricted feeding on physiological stress parameters in growing broiler breeders*. British Poultry Science. v.43, p.157–168.
- DEWAR, W. A.; WIGHT, P. A. L.; ANNE PEARSON, R. et al. (1982). *Toxic effects of high concentrations of zinc oxide in the diet of the chick and laying hen*. British Poultry Science. v.24, p.397-404.
- DZAJA, P.; GRABAREVIC, Z.; PERIC, J. et al. (1996). *Effects of histamine application and water-immersion stress on gizzard erosion and fattening of broiler chicks*. Avian Pathology. v.25, p. 359-367.
- FISHER, C.; LAURSEN-JONES, A. P. (1973). *The effect of copper sulphate on performance and the structure of the gizzard in broilers*. British Poultry Science. v. 14, p. 55-68.

- FITZGERALD, S. D.. Adenovirus Infections. In: Diseases of Poultry, 14th ed. Y.M. Saif, ed. Wiley-Blackwel, Ames, Iowa. 322–332, 2020.
- GENTLES, A.; SMITH, E.E.; KUBENA, L.F. et al. (1999). *Toxicological evaluations of cyclopiazonic acid and ochratoxin A in broilers*. Poultry Science. v.78, p.1380-1384.
- GJEVRE, A.G.; KALDHUSDAL, M.; ERIKSEN, G. S. (2013). *Gizzard erosion and ulceration syndrome in chickens and turkeys: a review of causal or predisposing factors*. Avian Pathology, v. 42, p. 297-303.
- GOOD, R. E.; HETRICK, J. M.; HANLEY, J. E. (1968). *Observations on gizzard ulcers in baby chicks*. Avian Diseases, v. 12, p. 327-331.
- GOODWIN, M. A. (1993). *Adenovirus inclusion body ventriculitis in chickens and captive bobwhite quail (Colinus virginianus)*. Avian Diseases. v. 37, p.568-571.
- GRABAREVIC, Z.; DZAJA, P.; PERIC, J. et al. (1999). *Effects of cimetidine on broiler fattening and on stress-induced gizzard erosion in chicken*. Acta Veterinaria Hungarica. v. 47 ,p. 233-241.
- GRABAREVIC, Z.; TISLJAR, M.; DZAJA P. et al. (1993). *Stress induced gizzard erosion in chicks. I. Gross and histopathological findings*. Journal of Veterinary Medicine. v.40, p. 265-270.
- HAN, H.; ZHOU, Y.; LIU, Q. et al. (2021). *Effects of ammonia on gut microbiota and growth performance of broiler chickens*. Animals.v. 11, p.1-11.
- HEDMAN, R.; PETTERSSON, H.; ENGSTRÖM, B. et al. (1995). *Effects of feeding nivalenol-contaminated diets to male broiler chickens*. Poultry Science. v.74, p.620-5.
- HOERR, F. J.; CARLTON, W. W.; YAGEN, B. (1981). *Mycotoxycosis caused by a single dose of T-2 toxin or diacetoxyscirpenol in broiler chickens*. Veterinary Pathology. v. 18, p. 652-664.
- HOLST, W.F.; HALBROOK, E.R. (1933). *A 'scurvy-like' disease in chicks*. Science. v.77, p.354.
- HOMIDAN, A. AL.; ROBERTSON, J.F.; PETCHEY, A.M. *Review of the effect of ammonia and dust concentrations on broiler performance*. World's Poultry Science Journal, v. 59, p.340-349.

- KALDHUSDAL, M.; HETLAND, H.; GJEVRE, A. G. (2012). *Non-soluble fibres and narasin reduce spontaneous gizzard erosion and ulceration in broiler chickens*. *Avian Pathology*. v.41, p.227-234.
- KAMALAVENKATESH, P.; VAIRAMUTHU, S.; BALACHANDRAN, C. et al. (2005). *Immunopathological effect of the mycotoxins cyclopiazonic acid and T-2 toxin on broiler chicken*. *Mycopathologia*, v.159, p.273-279.
- LI, Y.; XING, S.; WANG, X. et al. (2022). *Effects of Increasing Stocking Density on the Performance and Ileal Microbiota of Broilers*. *Japan Poultry Science*. v.59, p.291-296.
- LIM, T. H.; KIM, B. Y.; KIM, M. S. et al. (2012). *Outbreak of gizzard erosion associated with fowl adenovirus infection in Korea*. *Poultry Science*. v.91, p.1113–1117.
- LUNA, L.G. *Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology*. 3. ed. New York: McGraw-Hill, 1968. 258p.
- MANAROLLA, G.; PISONI, G.; MORONI, P. et al. (2009). *Adenoviral gizzard erosions in Italian chicken flocks*. *The Veterinary Record*. v.164, p.754-756.
- MAREK, A.; SCHULZ, E.; HESS, C. et al. (2010). *Comparison of the fibers of fowl adenovirus A serotype 1 isolates from chickens with gizzard erosions in Europe and apathogenic reference strains*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. v.22, p. 937–941.
- MEGHA, R.; FAROOQ, U.; Lopez PP. (2022). *Stress-Induced Gastritis*. May 1. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan–. PMID: 29763101.
- MEULEMANS, G.; BOSCHMANS, M., BERG, T. P. et al. (2001). *Polymerase chain reaction combined with restriction enzyme analysis for detection and differentiation of fowl adenovirus*. *Avian Pathology*, v.30, p.655–660.
- MILLER, D.; BAUERSFELD, P. E.; BIDDLE, G. N. et al. (1974). *Effect of sulfur containing dietary supplements on gizzard lining erosions*. *Poultry Science*. v.54, p. 428-435.
- MIRFENDERESKI, E.; JAHANIAN, R. (2015). *Effects of dietary organic chromium and vitamin C supplementation on performance, immune responses, blood metabolites, and stress status of laying hens subjected to high stocking density*. *Poultry Science*. v. 94, p.281–288.

- MIRZAZADEH, A.; GRAFL, B.; ABBASNIA, M. et al. (2021). *Reduced performance due to adenoviral gizzard erosion in 16-day-old commercial broiler chickens in Iran, confirmed experimentally*. *Frontiers in Veterinary Science*. v.8, p.1-8.
- OHH, M.; KIM, S.; PAK, S. C. et al. (2016). *Effects of dietary supplementation with astaxanthin on histamine induced lesions in the gizzard and proventriculus of broiler chicks*. *Journal of Animal Science*. v. 29, p. 872-878.
- OKAZAKI, T.; NOGUCHI, T.; IGARASHI, K. et al. (1983). *Gizzerosine, a new toxic substance in fish meal, causes severe gizzard erosion in chicks*. *Agricultural and Biological Chemistry*. v.47, p. 2949 -2952.
- ONO, M.; OKUDA, Y.; YAZAWA, S. et al. (2003). *Outbreaks of adenoviral gizzard erosion in slaughtered broiler chickens in Japan*. *The Veterinary Record*. v.153, p.775-779.
- POUPOULIS, C.; JENSEN, L. S. (1975). *Effect of high dietary copper on gizzard integrity of the chick*. *Poultry Science*. v. 55, p. 113-121.
- RODRIGUES, I.; CHOCT, M. (2018). *The foregut and its manipulation via feeding practices in the chicken*. *Poultry Science*. v.97, p.3188–3206.
- SAVORY, C.J.; MAROS, K. (1993) *Influence of degree of food restriction, age and time of day on behaviour of broiler breeder chickens*. *Behavioral Processes*. v. 29, p. 179–180.
- SCANES, C.G. (2016). *Biology of stress in poultry with emphasis on glucocorticoids and the heterophil to lymphocyte ratio*. *Poultry Science*. v. 95, p.2208–2215.
- SHI, D.; BAI, L.; QU, Q. et al. (2019). *Impact of gut microbiota structure in heat-stressed broilers*. *Poultry Science*. v. 98, p.2405–2413.
- SOUZA, L. F. A.; ESPINHA, L. P.; ALMEIDA, E. A. et al. (2016). *How heat stress (continuous or cyclical) interferes with nutrient digestibility ,energy and nitrogen balances and performance in broilers*. *Livestock Science*. v.192, p.39–43.
- SVIHUS, B. (2011). *The gizzard: function, influence of diet structure and effects on nutrient availability*. *World's Poultry Science Journal*, v. 67, p.207-224.