

Claiton Gonçalves Pereira

**AVIADENOVIRUS NA AVICULTURA INDUSTRIAL, FAMILIAR E VACINAS
COMERCIAIS EM MINAS GERAIS: DETECÇÃO POR REAÇÃO EM CADEIA
PELA POLIMERASE E AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Área: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Nelson Rodrigo da Silva Martins

Belo Horizonte
Escola de Veterinária da UFMG
2011

P436a Pereira, Claiton Gonçalves, 1971-

Aviadenovirus na avicultura industrial, familiar e vacinas comerciais em Minas Gerais: detecção por reação em cadeia pela polimerase e avaliação histopatológica de fígados / Claiton Gonçalves Pereira. – 2011.

40 p. : il.

Orientador: Nelson Rodrigo da Silva Martins

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária

Inclui bibliografia

1. Ave poedeira – Doenças – Teses. 2. Frango de corte – Doenças – Teses. 3. Vacina veterinária – Teses. I. Martins, Nelson Rodrigo da Silva. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 636.508 96

Dissertação defendida e aprovada em 27 de janeiro de 2011, pela Comissão Examinadora constituída por:



Prof. Nelson Rodrigo da Silva Martins
Orientador



Dr.ª. Bernadete Miranda dos Santos



Prof. José Sérgio de Resende

À minha saudosa mãezinha,
minha eterna “flô”.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela presença constante; amparo e fortalecimento no momento mais difícil da minha vida.

Aos meus irmãos, em especial a Silvânia, pela compreensão, incentivo e apoio.

Ao professor Nelson Martins pela orientação, confiança, sábios ensinamentos e, acima de tudo, pela sua amizade.

À querida professora Bernadete Miranda pela leitura das lâminas, grandes ensinamentos, oportunidades e a grande amizade.

À banca examinadora pelas contribuições para essa dissertação.

Aos colegas do Laboratório de Doenças de Aves, especialmente a Sandra e ao Alexis pelo grande apoio.

Aos professores da Escola de Veterinária da UFMG pelos ensinamentos, e aos funcionários pelos auxílios e atenção prestados.

Aos amigos de sempre em Pará de Minas pelo incentivo.

A todos que de alguma forma contribuíram para a concretização desse trabalho.

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| RESUMO | 9 |
| ABSTRAT | 10 |
| 1. INTRODUÇÃO | 11 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA | 12 |
| 2.1 O agente | 12 |
| 2.2 Epidemiologia | 12 |
| 2.3 Histórico | 14 |
| 2.4 Patogenia..... | 15 |
| 2.5 Diagnóstico | 17 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS | 18 |
| 3.1 Laboratórios | 18 |
| 3.2 Coleta de material..... | 18 |
| 3.3 Histopatologia | 19 |
| 3.4 Escore das lesões microscópicas | 20 |
| 3.5 Extração de DNA total | 20 |
| 3.6 Determinação espectrofotométrica da concentração de DNA | 21 |
| 3.7 Reação em cadeia pela polimerase | 21 |
| 3.7.1 Aviadenovirus | 21 |
| 3.7.2 Anemia infecciosa das galinhas | 21 |
| 3.8 Eletroforese em ágar gel | 22 |
| CAPÍTULO I - DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE AVIADENOVIRUS NA AVICULTURA INDUSTRIAL | 23 |
| RESUMO | 23 |
| 1. INTRODUÇÃO | 23 |
| 2. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 23 |
| CAPÍTULO II - OCORRÊNCIA DE AVIADENOVIRUS NA AVICULTURA DE SUBSISTÊNCIA | 28 |
| RESUMO | 28 |
| 1. INTRODUÇÃO | 28 |
| 2. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 29 |
| CAPÍTULO III - DETECÇÃO DO GENOMA DE AVIADENOVIRUS EM VACINAS AVÍCOLAS COMERCIAIS | 30 |
| RESUMO | 30 |
| 1. INTRODUÇÃO | 30 |
| 2. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 30 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| | CAPÍTULO IV - MICOTOXINA ASSOCIADA COM INFECÇÃO DE AVIADENOVIRUS | 33 |
| | RESUMO | 33 |
| 1. | INTRODUÇÃO..... | 33 |
| 2. | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 34 |
| | CONSIDERAÇÕES FINAIS | 36 |
| | REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA..... | 36 |

LISTA DE QUADROS

| | | |
|--|---|----|
| | Quadro 1 – Escore histopatológico de acordo com o grau de lesões hepática..... | 20 |
| | Quadro 2- Resultados da histopatologia de fígados de matrizes pesadas, poedeiras e frangos de corte..... | 27 |
| | Quadro 3 - Pesquisa de detecção do segmento de DNA de FAdV pela técnica de PCR em vacinas avícolas vivas liofilizadas | 31 |
| | Quadro 4- Resultados para a presença de DNA de FAdV e dosagem de aflatoxina de acordo com o escore encontrado em histopatologia nos fígados para cada grupo | 34 |

LISTA DE TABELA

| | | |
|--|--|----|
| | Tabela 1 – Resultados da PCR de acordo com as finalidades de produções avícolas industriais e a proporção de aves positivas para FAdV dentro de cada lote avaliado | 24 |
|--|--|----|

RESUMO

Apresenta-se um estudo sobre ocorrência de *Aviadenovirus* (FAdV) na avicultura mineira em razão da escassez de dados recentes no país e da sua descrição em países vizinhos. Como ponto de partida, pretendeu-se conhecer a ocorrência do vírus na população avícola industrial no Estado de Minas Gerais, caracterizada principalmente por galinhas e frangos de corte. Para tanto, foram coletados fígados de 50 poedeiras e de 300 frangos de corte, além de 25 fígados e 25 amostras de fezes de matrizes pesadas, representativos das principais regiões avícolas do estado. Foi demonstrada por PCR a presença do DNA de FAdV em 100% (25/25) das poedeiras adultas e em 36% (9/25) das pintainhas. As fezes de matrizes foram negativas para a presença do DNA do vírus sendo, porém, observada a presença de FAdV em 4/25 (16%) dos fígados. Em frangos de corte a positividade variou entre 24 e 86%, nos quais a pesquisa para o vírus da anemia das galinhas (CAV), realizada em quatro *pools*, constituídos de 10 amostras de fígados de cada lote, foi negativa. Não foi possível estabelecer correlação entre a detecção do genoma de FAdV e lesões histopatológicas nos fígados. A fim de se obter mais informações sobre a circulação da infecção, galinhas da avicultura familiar foram avaliadas (n=12), sendo detectado FAdV em 100% dessas aves. Com este mesmo objetivo, foram estudadas 15 partidas de vacinas avícolas vivas liofilizadas contra as doenças de Newcastle, Gumboro, bronquite infecciosa, encefalomielite, Marek e boubá aviária de diferentes laboratórios. A contaminação de vacinas avícolas com FAdV foi detectada em 20% (3/15), sendo duas contra a doença de Newcastle, fabricadas em janeiro/91 e maio/92 e uma contra a encefalomielite aviária fabricada em janeiro/94, todas produzidas pelo mesmo fabricante. Embora a dosagem de aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 nos fígados de um lote de frangos de corte tenha sido negativa, com sensibilidade de 2ppb, a avaliação histopatológica dos fígados foi sugestiva de alteração por outras micotoxinas. Conclui-se que a infecção por FAdV ocorre em aves da avicultura industrial de Minas Gerais e, a constatação de DNA de FAdV em galinhas de subsistência e vacinas avícolas comerciais, pode indicar importantes fontes de infecção e parcialmente justificar a alta disseminação de FAdV nas diferentes regiões avícolas.

Palavras-chave: Aviadenovirus, FAdV, hepatite por corpúsculo de inclusão, síndrome do hidropericárdio, PCR, galinha de postura, frango de corte, matriz de corte, vacina avícola.

ABSTRACT

An epidemiological study on the occurrence of *Aviadenovirus* (FAdV) in poultry of Minas Gerais, Brazil was performed, in view of the lack of recent information and of the occurrence in neighboring countries. During 2010, young and adult layer (n=50), broiler (n=300) and breeder (n=25) chickens, representative of the poultry industry of major Minas Gerais State poultry regions were examined. Livers or for breeders, livers and feces, were evaluated by a previously described PCR and by histopathology. FAdV DNA was found in 100% (25/25) of adult and in 36% (9/25) of immature layers. Broiler flocks presented FAdV varying from 24 to 86% entre os lotes estudados. In broiler breeders FAdV DNA was found in 16% of liver extracts (4/25), although not detectable in feces. Subsistence chickens (n=12) and live lyophilized commercial poultry vaccines (n=15) were examined in order to investigate their potential role in FAdV epidemiology. Subsistence chickens were from one of the intensified poultry regions and presented 100% positivity (12/12). Live vaccines were against Newcastle disease, infectious bursal disease, infectious bronchitis, avian infectious encephalomyelitis, Marek's disease and fowl pox and presented 20% positivity (3/15) only for Newcastle vaccine batches produced in January/1991 and May 1992 and encephalomyelitis produced in January 94, all from the same manufacturer. It was not possible to establish a correlation between FAdV DNA and histopathological alterations. The evaluation of livers for aflatoxins B1, B2, G1 and G2 did not reveal levels from 2ppb or above, although with suggestive histopathological changes, possibly associated to other mycotoxins. It was shown that the rate of infection with *Aviadenovirus* is high and widespread in the poultry industry and free-range chickens of Minas Gerais, Promiscuity between industrial and subsistence poultry may perpetuate *Aviadenovirus* infections. The detection of FAdV DNA in live vaccines produced up to 1992 may represent another important source of infection for industrial and free-range poultry. Falta comentar CAV.

Keywords: Fowl Adenovirus, FAdV, inclusion body hepatitis, hidropericardium syndrome, PCR, laying hen, broiler, die cutting, poultry vaccine.

1. INTRODUÇÃO

Aviadenovirus (FAdV – Fowl Adenovirus) tem uma distribuição mundial e parece ser onipresente na população avícola, como demonstrado em sorologia e por isolamento viral em espécimes tomadas de aves doentes e normais.

A infecção pode ser assintomática (infecção latente) ou associada com uma ampla variedade de sinais clínicos. Embora muitas doenças sejam associadas com a infecção de FAdV, existem evidências conflitantes a respeito do seu papel como agente etiológico primário sob condições de campo. Alguns autores têm demonstrado seu papel como agente etiológico primário, enquanto outros têm suportado a hipótese que a maioria dos FAdV atua como patógeno secundário em associação com agentes imunodepressores, tais como os vírus da anemia infecciosa das galinhas e doença de Gumboro e não infecciosos como as micotoxinas. Algumas dessas discrepâncias podem ser baseadas em diferenças na virulência entre isolados do mesmo ou diferente sorotipo, assim como diferença no nível de susceptibilidade entre as linhagens de galinhas. Em muitos estudos, a rota de inoculação foi extremamente importante, com muitos isolados falhando em causar doença quando administrado por via oral ou por contato direto, mas foram altamente patogênicos quando inoculados por via parenteral.

Nos últimos anos, galinhas infectadas naturalmente com FAdV têm emergido com doenças importantes economicamente. A hepatite por corpúsculo de inclusão (HCI) nas galinhas é reconhecida desde 1963. Hoje, a HCI clássica, afetando frangos de corte de 3 a 5 semanas de idade é vista como uma doença esporádica com baixa mortalidade nos lotes. Contudo, recentes surtos de HCI têm ocorrido em frangos com menos de 3 semanas de idade. Embora as lesões macroscópicas sejam similares a HCI clássica, as mortalidades experimentadas nesses surtos agudos são mais expressivas. A HCI é caracterizada por

necrose hepática focal e corpúsculo de inclusão intranuclear nos hepatócitos.

Outra recente condição patológica importante associada com FAdV é a síndrome da hepatite/hidropericárdio (SHH), o qual tem causado grande impacto econômico na produção avícola intensiva em algumas áreas do mundo. Trata-se de uma importante doença, previamente desconhecida na indústria avícola, que afeta principalmente frangos de corte de 3 a 6 semanas de idade, e caracteriza-se por início súbito, alta mortalidade – variando de 20 a 75%, típico hidropericárdio e fígado aumentado de volume e friável, com corpúsculo de inclusão intranuclear.

Uma característica da epidemiologia de FAdV é o número excepcionalmente grande de sorotipos que podem ser isolados em uma granja. Assim como, não é incomum isolar dois ou mais sorotipos da mesma ave, sugerindo que existe pouca proteção cruzada.

A ausência de aparente correlação entre sorotipo e patogenicidade, a viabilidade econômica na formulação de uma vacina efetiva é baixa, uma vez que esse achado sugere que pode ser necessário incluir todos os sorotipos para cobrir a possibilidade de variantes patológicas ocorrendo com todos os sorotipos de FAdV. A SHH causada pelo FAdV-4 tem sido controlada com o uso de vacina autógena inativada com formalina preparada de suspensão de fígado de galinhas afetadas pela doença.

O diagnóstico de infecção de FAdV é usualmente acompanhado por isolamento do vírus em cultivo celular, microscopia eletrônica e histopatologia. Os testes para diagnóstico sorológico contemplam imunofluorescência, imunoperoxidase, imunodifusão, vírus neutralização e ELISA.

No entanto, os procedimentos oculares de diagnóstico evoluíram para uma ciência altamente sofisticada. A necessidade de testes diagnósticos mais confiáveis que contemplam alta sensibilidade e

especificidade se baseiam, atualmente, em biologia molecular. A reação em cadeia pela polimerase (PCR) é uma ferramenta molecular que permite a detecção de parte específica do genoma de um agente infeccioso, onde seu custo x benefício suplantam os tradicionais testes usados rotineiramente em laboratórios de diagnóstico.

A inexistência de dados epidemiológicos acerca de *Aviadenovirus* no Brasil foi o motivo de interesse para este trabalho. Como ponto de partida, pretendeu-se conhecer a ocorrência do vírus na população avícola industrial no Estado de Minas Gerais, caracterizada principalmente pela produção de galinhas e frangos de corte. A fim de se obter mais informações sobre a circulação da infecção foram avaliadas criações avícolas de subsistência e, sobre potenciais fontes adicionais, foram avaliadas vacinas avícolas vivas comerciais da década de 90 e atuais.

O conhecimento da circulação da infecção de FAdV para a indústria avícola comercial é um importante passo para o estabelecimento de medidas profiláticas específicas.

1. REVISÃO DE LITERATURA

2.1- O Agente

Os adenovírus são membros da família *Adenoviridae* e, atualmente estão classificados em quatro gêneros perdendo, portanto, as designações de grupo I, II ou III. Em aves, as adenovirose ocorrem por integrantes dos gêneros *Aviadenovirus*, *Siadenovirus* e *Atadenovirus*. Enquanto o gênero *Mastadenovirus* ocorre somente em mamíferos. *Aviadenovirus* (FAdV – Fowl Adenovirus) infectam apenas aves, e o gênero integra 7 espécies virais designadas A, B, C, D, E, adenovírus dos gansos e adenovirus de falcão, representados em 13 sorotipos. A espécie protótipo de FAdV é o adenovírus de galinha A, sorotipo 1, composta pelas estirpes CELO, 112 e Phelps (ICTV, 2010).

A classificação dos adenovírus é determinada por características antigênicas e genotípicas, baseada em distância filogenética das sequências dos genes da protease, pVIII, proteína hexon e DNA polimerase através de análise do polimorfismo dos comprimentos dos fragmentos de restrição enzimática (RFLP), espectro de hospedeiros, patogenicidade, neutralização cruzada e habilidade de recombinar (MacFerran *et al.*, 1977; Raue *et al.*, 1998).

A principal proteína de superfície viral é a proteína hexon, onde os determinantes antigênicos específicos de tipo, grupo e subgrupo estão localizados. A proteína hexon é caracterizada por dois componentes funcionais: a região conservada do pedestal (P1 e P2) e o *loop* variável (L1 a L4). Exceto L3, a região do *loop* está localizada na superfície da proteína e interage com a resposta imune do hospedeiro. Todos os *Aviadenovirus* compartilham determinante antigênico específico do grupo (Raue *et al.*, 1998).

Os adenovírus são constituídos de DNA de fita dupla não segmentado. As partículas virais são de simetria regular, formadas por um capsídeo em arranjo icosaédrico de 252 capsômeros hexagonais, compostos de 240 *hexons*, 64 *pentons* e 12 fibras. São vírus não envelopados e resistentes a detergentes, solventes lipídicos, fenol 2%, etanol 50%, tripsina, variações de pH entre 3-9 e, algumas estirpes, à temperatura de 60-70°C por 30 minutos. Entretanto, são sensíveis ao formol a 1:1000 (MACFERRAN *et al.*, 1977).

2.2- Epidemiologia

O primeiro isolado de *Aviadenovirus* (FAdV) em aves foi de surto de doença respiratória em codornas. Desde então, o vírus obteve uma distribuição mundial e parece ser onipresente na população avícola, como demonstrado por monitoramento sorológico e estudos virológicos em espécimes tomadas de aves doentes e saudáveis (Adair e Fitzgerald, 2008).

A infecção pode ter surgido em galinha d'angola e faisão e, provavelmente, ocorre em todas as espécies de aves (McFerran e Smyth, 2000). Nas espécies de aves domésticas, todas as idades são susceptíveis (Adair e Fitzgerald, 2008). Contudo, diferença na susceptibilidade de linhagens de frangos de corte à infecção com FAdV foi relatada (Roy *et al.*, 2004).

A transmissão vertical foi estudada por Grgic *et al.* (2006) em órgãos de pintos de um dia de idade oriundos de 6 lotes de matrizes criadas geograficamente separadas. A PCR detectou a presença da sequência de DNA de FAdV em 5 dos 6 lotes de matrizes em 24% dos órgãos das progênies. De acordo com esses pesquisadores a transmissão vertical e o estabelecimento de infecção latente com FAdV pode ocorrer em galinhas.

Após um período de excreção o vírus parece torna-se latente, presumivelmente devido ao desenvolvimento de imunidade local. Quando a imunidade é perdida, após 8 a 20 semanas ou durante o período de pico de produção de ovos, ocorre a reativação da atividade viral, garantindo a transmissão máxima para a próxima geração através do ovo (MacFerran *et al.*, 1977).

No entanto, a transmissão vertical não ocorreu em matrizes nos estudos de Philippe *et al.* (2007). Nesse trabalho, órgãos de pintos de 1 dia de idade, originários de um lote de matrizes acometido por hepatite por corpúsculo de inclusão aos 10 dias de vida, foram avaliados por PCR e isolamento viral para possível transmissão vertical de FAdV no pico de produção de ovos. Em nenhum dos órgãos dos pintos testados foi detectado DNA de FAdV na PCR e não foi isolado vírus das mesmas amostras. O monitoramento sorológico dessas matrizes detectou altos títulos de anticorpos neutralizantes a partir da 12ª semana de idade, possivelmente pela reativação do vírus ou reinfeção com o mesmo sorotipo. De acordo com esses autores, a presença de altos títulos de anticorpos neutralizantes

nas matrizes pode prevenir a transmissão vertical.

Reece *et al.* (1985) foram incapazes de isolar FAdV-8 de ovos postos por um período de duas semanas após a infecção das galinhas.

De acordo com MacFerran *et al.* (1977), o principal local de replicação do vírus parece ser nos tratos respiratório e digestivo. Assim, pintos eclodidos de ovos infectados podem excretar altas cargas virais nas fezes (Abdul-Aziz e Hasan, 1995). Em adição, vírus replicando nas mucosas nasal e traqueal, conjuntiva e nos rins, sugere que o vírus também esteja presente em outras secreções ou excreções (MacFerran *et al.*, 1977). No entanto, a eliminação de vírus parece não ocorrer antes de 2 a 4 semanas, provavelmente porque os anticorpos maternos impedem a reativação do vírus latente (Shane, 1996).

A excreção de vírus nas fezes segue um padrão diferente em galinhas jovens e adultas. Nas jovens, altos títulos de vírus são excretados por períodos maiores que nas aves adultas (Cook, 1972).

Uma característica da epidemiologia da infecção de FAdV é a possibilidade de 2 ou mais sorotipos serem isolados na mesma ave (Singh *et al.*, 2002, Hess *et al.*, 1999), sugerindo que existe pouca proteção cruzada (Adair e Fitzgerald, 2008). Esse fenômeno é observado quando uma granja é povoada por pintinhos oriundos de diferentes lotes de matrizes infectadas. Com o decréscimo de anticorpos maternos, as progênies passam a eliminar os vírus adquiridos verticalmente e ocorre uma considerável mistura de sorotipos dentro do lote (Shane, 1996).

Sob condições de campo, o vírus não parece ser altamente contagioso dentro de um lote (McFerran *et al.*, 1977). Cook (1970) sugeriu que o vírus leva semanas para infectar um lote de galinhas, e essa lenta disseminação foi observada em lotes infectados naturalmente (Van Eck *et al.*, 1976). Isso é provavelmente porque a transmissão lateral não é um método

eficiente de disseminação. Contudo, sob condições naturais e, especialmente se infecções concorrentes ou micotoxinas estão presentes, a disseminação dentro de um lote pode ser extremamente rápida (McFerran *et al.*, 1977).

Um estudo epidemiológico de 47 surtos de hepatite por corpúsculo de inclusão na Índia (1990-1994) acometeu frangos de corte de 2-7 semanas de idade, contudo o número maior de surtos (40/47) ocorreu no grupo de aves de 3-5 semanas. A maioria desses surtos (20/47) foi associada com micotoxina – aflatoxina (Singh *et al.*, 1996). Shivachandra *et al.* (2003) sugeriu que a presença de aflatoxinas (B1, B2, G1, G2) nas matérias primas da ração é um significativo fator de risco para surtos de SHH causada por FAdV-4. Altas temperatura e umidade relativa do ar são considerados fatores favoráveis para o crescimento de fungos e conseqüente aumento da produção de toxinas nos grãos.

A disseminação por fômites também é importante, principalmente pelo homem. De acordo com o resultado obtido em estudo epidemiológico conduzido pelo Centro Nacional de Pesquisa Agrícola do Paquistão, foi constatado que o principal fator de risco associado com infecção de FAdV-4 em frangos de corte foi a equipe de vacinação (Akhtar *et al.*, 1992).

Outra forma reconhecida de introdução de FAdV em produções avícolas é através de vacina. Vírus transmitidos através de ovos embrionados são frequentemente reativados em culturas celulares preparadas de embriões e pintos jovens tomados de lotes infectados (McFerran *et al.*, 1977; Shane, 1996). Grupos independentes relataram o isolamento de FAdV em cultura celular quando tentavam a adaptação dos vírus da leucose aviária, encefalomielite aviária, laringotraqueíte e bronquite infecciosa das galinhas (McFerran *et al.*, 1977). De acordo com Shane (1996), o FAdV-4 responsável pela SHH pode ter sido introduzido na avicultura comercial do Paquistão através de vacina contra a doença de Newcastle.

2.3- Histórico

De modo geral, as adenovirose, especialmente infecções por *Aviadenovirus* têm pouca expressão clínica. Em alguns casos por causa das aves ainda possuírem alguma imunidade materna quando infectadas ou, em outros, os vírus têm baixa virulência (MacFerran e Smyth, 2000). Assim, um estudo na Dinamarca foi incapaz de detectar algum afeito da infecção subclínica de FAdV na performance de frangos de corte (Jorgensen *et al.*, 1995).

Historicamente, infecções com os vírus da doença de Gumboro (VDG) e anemia infecciosa das galinhas (CAV), e não infecciosos como as micotoxinas são conhecidos como agentes imunodepressores. Portanto, a presença desses agentes podem atuar de forma sinérgica ou potencializar a infecção de FAdV, capacitando esse vírus como importante patógeno em alguns surtos de doenças. De acordo com resultados prévios, o sinergismo foi observado experimentalmente por dupla infecção e infecção vertical simultânea de FAdV e CAV na progênie de galinhas (Toro *et al.*, 2000).

A hepatite por corpúsculo de inclusão (HCI) foi primeiramente reconhecida por Helmboldt e Frazier em 1963 nos E.U.A. A doença clássica, afetando especialmente frangos de corte de 3-6 semanas de idade, é vista de forma esporádica com mortalidade variando de 0 a 15% nos lotes. A doença também foi relatada em outras espécies de aves, incluindo peru, pombo, ganso, codorna, falcão e psitacídeos (Hess, 2000; Ojkic *et al.*, 2008) entre outras.

No Brasil, Back *et al.*, (2008), relataram a ocorrência de HCI em frangos de corte, onde casos clínicos foram observados em 2005, 2006 e no início de 2007. Estiveram associados a uma linhagem, porém de diferentes lotes de avós e matrizes. O doença foi observada em frangos de 2 a 3 semanas. A morbidade foi muito próxima da mortalidade que variou de 0.5 a 8% nos lotes afetados. Onde houve mortalidade, foi também observado redução do desempenho, principalmente piora na

conversão. Os frangos acometidos eram predominantemente de origem de matrizes jovens.

O acompanhamento epidemiológico mostrou que não houve disseminação lateral. Os lotes doentes sempre tiveram origens comuns, evidenciando a transmissão vertical. Na necrópsia observou-se fígado bastante aumentado, pálido e as vezes com algumas hemorragias, rins aumentados e pálidos e ocasionalmente hidropericárdio. Exames histopatológicos confirmaram a presença de inclusões intranucleares nos hepatócitos compatíveis com HCl. Para diagnóstico diferencial foram consideradas doenças nutricionais e micotoxinas.

Embora o papel patogênico da maioria dos FAdV ainda seja questionável, a infecção é associada a uma ampla variedade de apresentações clínicas em galinhas afetando vários tecidos e órgãos. Estas incluem pneumonia e traqueíte (Dhillon e Kibeng, 1987), pancreatite (NakamuRa *et al.*, 2002), erosão de moela (Ono *et al.*, 2003), proventriculite (Guy *et al.*, 2005), glomerulonefrite (Wilson *et al.*, 2010).

A SHH é uma doença emergente, previamente desconhecida, e tem causado grande impacto econômico na indústria avícola comercial em algumas áreas do mundo. A primeira epidemia de SHH em frangos de corte foi relatada em Angara no Paquistão em 1987 (Cheema *et al.*, 1989). E foi subsequentemente relatada no Iraque (Abdul-Aziz e Al-Attar, 1991), Índia (Gowda e Satyanarayana, 1994), México, Equador, Peru e Chile (citado por Voss *et al.*, 1996), América Central e do Sul (Shane, 1996) e Japão (Abe *et al.*, 1998).

Um agente infeccioso foi sugerido como possível infecção, com base em transmissão experimental, onde frangos foram infectados pela inoculação intramuscular (IM) de uma suspensão de fígado de aves acometidas (Anjum *et al.*, 1989). Estudos subsequentes confirmaram que um adenovírus foi associado com a condição, pela demonstração de corpúsculo intranuclear basofílico e eosinofílico e pela

visualização de partículas virais por microscopia eletrônica no fígado de aves acometidas pela doença (Cheema *et al.*, 1989). Posteriormente a doença foi reproduzida em aves SPF usando o vírus de caso de campo (citado por Cowen *et al.*, 1996), provando a associação de FAdV-4 como o agente responsável em causar a doença.

A transmissão horizontal ocorre por meio mecânico ou contaminação por fezes infectadas. O agente é altamente patogênico e se espalha rapidamente de lote para lote e fazenda para fazenda. Contudo, Toro *et al.* (2001) concluiu que uma associação de FAdV-4 e um agente imunodepressor é necessário para expressar a síndrome em frangos de corte quando transmitido horizontalmente.

A síndrome tem algumas similaridades com a hepatite por corpúsculo de inclusão, mas diferencia pelo severo hidropericárdio e alta mortalidade. Acomete primariamente frangos de corte de 3 a 5 semanas de idade e, ocasionalmente, poedeiras e matrizes jovens. A doença é caracterizada por início súbito e alta morbidade, com taxa de mortalidade acima de 75% em frangos e abaixo de 10% em poedeiras. O curso da doença sob condições naturais varia de 5 a 7 dias.

A síndrome tem sido controlada com o uso de uma vacina autógena preparada de uma suspensão de fígado de aves afetadas pela doença (Cheema *et al.*, 1989; Shane, 1996). A prevenção da doença é beneficiada pela implantação de medidas de biossegurança contempladas nos programas oficiais de saúde animal.

2.4- Patogenia

Os diferentes locais de recuperação viral de aves infectadas naturalmente pelos *Aviadenovirus* indicam que o vírus está amplamente distribuído no organismo. Assim, FAdV foram isolados de sangue periférico, bolsa cloacal, fezes, traquéia, conjuntiva, faringe, pulmões, rins, tonsilas cecais, baço e fígado (MacFerran *et al.*, 1977).

Kawamura e Tsubahaet (1963) infectaram pintos de um dia de idade via oral com FAdV-1 (Ote) e demonstraram a disseminação de vírus por todo o corpo da ave, com títulos máximos na traquéia e fezes. Em aves de 12 meses de idade, infectadas via intravenosa com a estirpe Ote, um padrão similar foi visto, embora o vírus não foi re-isolado após o nono dia pós-infecção, mas altos títulos foram detectados na traquéia, bile, fígado e intestino (Kawamura e Horiuchi, 1964).

Usando duas estirpes de FAdV-1 (B1209 e Phelps) para infectar galinhas pelas rotas intravenosa e intra-traqueal ou exposição por aerosol, Aghakhan e Pattisson (1974) também encontraram o vírus em muitos órgãos, sendo recuperados frequentemente de pulmão, traquéia e fezes.

Cook (1974) também recuperou vírus de muitos órgãos e encontrou altos títulos de vírus no fígado e intestino.

De acordo com Adair e Fitzgerald (2008), FAdV tem uma particular predileção para replicar em células de fígado. Contudo, Romanova *et al.* (2009) baseados no número de cópias do genoma de FAdV (PCR em tempo real) em órgãos de galinhas de 2 semanas de idade infectadas experimentalmente intramuscular com FAdV-9 demonstraram que, pelo menos em infecção precoce, a replicação do vírus é maior nas tonsilas cecais, seguidas pelo fígado e bolsa cloacal.

No estudo de Grgic *et al.* (2006) realizado em órgãos de pintos de corte de 1 dia de idade infectados verticalmente, rins (18%), fígado (25%), bolsa cloacal (25%) e baço (28%) foram positivos para infecção de FAdV-9 em PCR específica para este sorotipo. Embora ainda não esteja demonstrado o(s) órgão(s) envolvido(s) no estabelecimento de infecção latente, foi sugerido que o baço seria o órgão de eleição para testes de detecção de infecção.

Das evidências disponíveis, parece que todas as estirpes seguem o mesmo padrão de infecção. Após uma replicação inicial provavelmente ocorre uma viremia,

resultando na dispersão do vírus para todos os órgãos (MacFerran *et al.*, 1977).

A reprodução experimental de doenças envolvendo infecção de FAdV tem mostrado resultados divergentes. Muitos estudos têm enfatizado o papel predisponente dos vírus da doença de Gumboro (VDG) e anemia infecciosa das galinhas (CAV) e não infecciosos como as micotoxinas em desencadear a hepatite por corpúsculo de inclusão (HCI) e a síndrome da hepatite/hidropericárdio (SHH). Assim como, o padrão de lesão varia conforme a dose, via de inoculação, potencial de virulência, idade e *status* imune das aves para doenças imunodepressivas (Toro *et al.*, 2000).

Cowen *et al.* (1996), usando um isolado chileno (LA/C) obteve 45% de mortalidade quando pintos de 2 dias de idade foram inoculados com 10^5 unidades formadoras de placas (UFP). Este nível de mortalidade diminuiu para 7% quando infectaram pintos de 3 semanas de idade. Estes autores sugeriram que surtos de SHH ocorrendo em aves mais velhas, provavelmente envolvem marcada imunodepressão.

Mazaheri *et al.* (1998) relataram mortalidade de 100% quando administraram via oral (10^3 - 10^5 UFP) de duas estirpes de FAdV-4 (K31- Paquistão e K1013- Equador) em pintos SPF de 1 dia de idade, sugerindo o papel de agente etiológico primário de FAdV-4.

De acordo com os resultados de Toro *et al.* (2000) a inoculação intramuscular do isolado chileno 341 em pintos SPF de 20 dias de idade induziu 10% de mortalidade devido a SHH. Enquanto a infecção oral com o mesmo isolado não produziu lesões nem mortalidade nas aves. Já os pintos inoculados intramuscular com o CAV (isolado 10343) aos 14 dias de idade e após 21 dias (grupo 1), 28 dias (grupo 2) e 35 dias (grupo 3) com FAdV via oral, mimetizando melhor as condições de infecção no campo, mostraram lesões e mortalidade variadas de acordo com o curso de desenvolvimento da infecção de CAV. Nenhum fígado das aves dos grupos B e C

mostraram corpúsculo de inclusão nos hepatócitos.

Gallina *et al.* (1973) descreveram os achados histopatológicos de fígados de galinhas infectadas naturalmente com FAdV e clinicamente doentes. A alteração inicial foi caracterizada por infiltrado celular na tríade portal, composta de linfócitos e fibroblastos. Simultaneamente foi notada uma suave degeneração gordurosa, com vacúolos de gordura no citoplasma dos hepatócitos. Corpúsculos de inclusão intranuclear eosinófilo foram encontrados nos hepatócitos de fígados menos severamente envolvidos. Em fígados mais severamente envolvidos, um infiltrado celular na área portal tornou-se muito extensivo e consistido, primariamente, de linfócitos e um moderado número de heterófilos. Área focal de hemorragia estava frequentemente presente e a degeneração gordurosa tornou-se mais severa e difusa. Outra característica de um envolvimento severo foi de grandes áreas de necrose fibrinóide com ou sem reação granulomatosa. Aumento de fibrose nas áreas portal e interlobular foram comuns, juntamente com hiperplasia biliar e proliferação de ductos biliares.

2.5- Diagnóstico

O diagnóstico de infecção de FAdV é usualmente acompanhado por isolamento do vírus em ovos SPF embrionados ou em cultivo celular, microscopia eletrônica e histopatologia (Cheema *et al.*, 1989).

A maioria dos isolados de galinha foram feitos em células de rins de pintos ou células de embrião de galinha. Embora seja possível que todos os FAdV replicam em ovos embrionados, nem todos os isolados causam lesões reconhecíveis. A membrana corioalantóide foi a rota mais sensível de inoculação que a cavidade alantóide. Contudo, quando material oriundo de infecção natural de FAdV foi usado, somente 3 isolados foram conseguidos, comparado com os 45 em cultivo celular. Sinais e lesões produzidos no embrião são morte, nanismo, esplenomegalia, congestão e hemorragias generalizada e acúmulo de

uratos nos túbulos renais. Os hepatócitos usualmente contêm corpúsculo de inclusão intranuclear basofílico ou eosinofílico (Adair e Fitzgerald, 2008).

Embora corpúsculo de inclusão intranuclear nos hepatócitos sejam sugestivos de infecção de FAdV, se presentes, podem variar em tamanho e propriedades tintoriais, de aumentado e basofílico a pequeno e eosinofílico (Goryo *et al.*, 1988). Inclusões de FAdV podem estar misturadas com herpesvírus, circovírus ou poliomavírus, dependendo da espécie aviária em questão (Latimer *et al.*, 1997). As lesões histopatológicas, principalmente aquelas encontradas no fígado, não são patognomônicas e podem perfeitamente ser encontradas em outras diversas patologias (Gallina *et al.*, 1973). A microscopia eletrônica é cara e não está disponível universalmente, no entanto, a localização do vírus, tamanho, morfologia e arranjo do capsídeo são características razoáveis de FAdV (Adair e Fitzgerald, 2008).

Os testes de diagnóstico sorológico contemplam imunofluorescência, imunoperoxidase, imunodifusão em ágar gel, vírus neutralização e ELISA. O problema com o teste de ELISA é a interpretação dos resultados, já que anticorpos contra o FAdV são comuns em aves doentes e saudáveis. Além disso, as aves são frequentemente infectadas com diferentes sorotipos. O teste de imunoperoxidase inclui prejuízo de antigenicidade após fixação em formalina, excessiva coloração inespecífica e inabilidade para detectar infecção latente. Já o teste de imunofluorescência requer tecido congelado e também pode ocorrer excessiva coloração inespecífica (Fitzgerald *et al.*, 1994).

Muitos trabalhos foram conduzidos com o teste de imunodifusão em ágar gel. O teste é barato, simples e todos os sorotipos reconhecidos compartilham antígenos precipitantes em comum. No entanto, Fadly *et al.*, (1980), demonstraram que a utilização desse teste no monitoramento de um lote de galinhas livres de patógenos específicos (SPF), não detectou a infecção

de FAdV por pelo menos uma geração. O teste de vírus neutralização é o método sorológico disponível mais sensível para detectar a infecção de FAdV. Contudo, é tipo específico, caro e demorado.

A necessidade de testes diagnóstico mais confiáveis que contemplam altas sensibilidade e especificidade evoluiu para uma ciência altamente sofisticada, e muitos procedimentos baseados em biologia molecular foram desenvolvidos.

A reação em cadeia pela polimerase (PCR) é uma técnica molecular qualitativa que permite a detecção de parte específica do genoma de FAdV. A técnica permite a detecção de quantidades mínimas de DNA e possibilita que o genoma do vírus seja amplificado diretamente de amostras de campo, evitando assim o passo extra da necessidade de replicar o agente em cultura celular (Jiang *et al.*, 1999; Xie *et al.*, 1999; Meulemans *et al.*, 2001). De acordo com Jiang *et al.* (1999), foi possível através da análise dos produtos de PCR distinguir FAdV-8 do vírus CELO, baseado no tamanho do amplicon gerado pelo FAdV-8 ser maior que o outro.

Romanova *et al.*, (2009), desenvolveram promissores variantes da PCR. Com a *Nested-PCR* foi constatada uma sensibilidade aumentada e, com a PCR em tempo real (RT-PCR), mostraram o grande valor desta técnica em quantificar cópias do genoma viral, o qual foi possível identificar em qual órgão ocorre a maior replicação de FAdV num dado momento.

Uma adicional vantagem da PCR, combinada com a análise do polimorfismo dos comprimentos dos fragmentos de restrição enzimática (RFLP), é a possibilidade de diferenciar isolados de FAdV em grupos sorológicos (Raue e Hess, 1998; Toro *et al.*, 1999; Hess *et al.*, 1999). Outro interessante achado desta associação foi a detecção de dois diferentes sorotipos na mesma amostra. Isso reflete a situação de campo, onde dois ou mais sorotipos podem ser isolados da mesma ave. O fato da contaminação com adenovírus associados de aves (avian adenovirus

associated vírus - AAV) também não influenciam a PCR, visto que esses vírus são mais relacionados geneticamente aos parvovírus (Hess *et al.*, 1999).

Erny *et al.*, (1991), intensificaram os estudos da associação de PCR com RFLP. O estudo dos fragmentos clivados por enzimas de restrição específicas nos produtos da PCR foram analisadas através da "PERCENTAGEM COMMENTING RESTRICTION FRAGMENT" (PCRF). Através dessa tecnologia, esses autores foram capazes de diferenciar geneticamente isolados de campo hipervirulentos daqueles suavemente virulentos.

Embora o mapeamento por enzimas de restrição, por si só, não seja suficiente para determinar regiões do genoma de FAdV responsáveis pela virulência, espera-se em pesquisa usar estes fragmentos genômicos para produzir vírus recombinantes. Esses vírus quimera forneceriam uma ferramenta mais refinada para determinar a significância de várias regiões do genoma de FAdV em virulência (Erny *et al.*, 1991).

2. MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Laboratório

A pesquisa foi realizada nos laboratórios do Setor de Doenças das Aves do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e no Laboratório de histopatologia do Departamento de Patologia, ambos da Escola de Veterinária - Universidade Federal de Minas Gerais - EV/UFMG.

3.2- Coleta de material

Para este estudo foram coletadas amostras em nove unidades de produção avícola industrial. As granjas estão localizadas geograficamente nas principais regiões de produção de aves industriais do Estado de Minas Gerais, consideradas pelos números expressivos de produção.

Na mesma unidade produtora de ovos, caracterizada por cria, recria e postura

comercial, foram coletados fígados de galinhas (n=25) em final de produção e de pintainhas de 18 dias de idade (n=25). Foi relatado que as galinhas apresentaram um quadro de problema respiratório com uma temporária queda na produção de ovos. Para o tratamento foi utilizado tiamulina, mas somente após 20-25 dias foi restaurada a produção. As pintainhas foram criadas em piso e apresentaram problemas sanitários na primeira semana de vida, sendo relatadas onfalite e mortalidade elevada.

No lote de matrizes pesadas, as coletas foram realizadas em duas etapas, sendo que na primeira foram coletados os fígados (n=25), oriundos de 15 galos e 10 galinhas e, após um intervalo de 90 dias, foram coletadas amostras de fezes (n=25). A coleta em dois tempos e amostras diferentes, foi em vista dos resultados prévios da baixa detecção do genoma de FAdV por PCR nos fígados destas aves. Assim, pretendeu-se investigar se através das fezes poder-se-ia ampliar o espectro de detecção. A granja oferecia uma excelente estrutura física e um rigoroso sistema de biossegurança. Nenhum relato negativo foi feito na produção dessas galinhas.

Para o estudo em frangos de corte foram colhidas amostras de fígado (n=300), sendo 50 órgãos em cada um dos seis diferentes abatedouros no Estado de Minas Gerais inspecionados pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF). O histórico dos lotes não era conhecido, nem tampouco as práticas de produção. Exceto no lote de número 2, que registrou mortalidade expressiva na primeira semana, por causa de descarte de aves refugas devido à síndrome do trânsito rápido.

Os fígados de galinhas de subsistência (n=12) criadas em sistema semi-intensivo foram colhidos de forma aleatória, sendo 8 amostras colhidas em uma propriedade rural e 4 em outra, ambas localizadas em proximidade com a avicultura industrial de corte. Nestas propriedades não foram constatadas a implantação de práticas de biossegurança, onde aves de diferentes origens e idades são alocadas no mesmo ambiente, além da presença de outras

espécies de aves domésticas. Durante o ciclo de produção foram relatados problemas respiratórios, digestivos e alta mortalidade em idade inicial, embora os fígados colhidos das aves para este estudo tinham aparência saudável.

No ato da coleta, dois fragmentos de cada fígado foram colhidos, sendo um colocado em vidro contendo formalina 10% tamponada e o outro em tubos tipo *Eppendorf* de 1,5ml. As amostras de fezes também foram colhidas e armazenadas em tubos, que foram congelados a -20°C até o momento da análise.

Para o estudo da possível contaminação de vacinas avícolas comerciais, foram avaliadas 15 partidas de vacinas avícolas vivas liofilizadas contra as doenças de Newcastle, Gumboro, bronquite infecciosa, encefalomielite aviária, boubá aviária (produzidas em ovos embrionados) e Marek (produzida em cultivo celular) de diferentes laboratórios, produzidas na década de 90 e recentes. Todas as vacinas utilizadas no estudo estavam conservadas a -20°C e lacradas, sendo reconstituídas somente no momento da extração de DNA.

Para a pesquisa de aflatoxina foram colhidos 20 fígados de um lote de frangos de corte com 42 dias de idade, onde uma amostra de cada órgão foi retirada para avaliação histopatológica e um *pool* de 5 fígados, formando 4 grupos, foram enviados a um laboratório especializado para quantificar as aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 através da técnica de cromatografia em camada delgada com sensibilidade de 2ppb.

3.3- Histopatologia

Os fragmentos de fígado foram fixados em formalina 10%, solução salina, tamponado em pH7,2 por um período mínimo de 24 horas. Após a fixação, os fragmentos foram lavados em água destilada e, posteriormente foram desidratados com graus variados de etanol a 70, 80 e 95% de concentração, com intervalo de duas horas para troca de cada solução. Seguiram-se duas trocas de álcool absoluto, com intervalo de meia hora cada. Os fragmentos

foram clarificados com duas trocas de xilol, com intervalo de uma hora cada e, posteriormente, colocados em banho de parafina a 58°C por meia hora e, definitivamente incluídos em parafina. Os blocos foram cortados em secções com espessura de quatro micrômetros. As secções foram fixadas em lâmina e coradas pela técnica de hematoxilina e eosina e cobertas com lamínula. As lâminas foram examinadas por microscopia de luz.

3.4- Escore das lesões microscópicas

Os vinte cortes histológicos dos fígados foram avaliados ao microscópio óptico quanto a estimativa dos graus de necrose hepática, de vacuolização dos hepatócitos, de hiperplasia dos ductos biliares e de infiltração periportal de células inflamatórias. Todos os cortes histológicos foram observados em toda a sua extensão e os graus de lesões atribuídos conforme a distribuição dessas lesões na lâmina. Não focou-se a quantificação do grau de lesão em área específica, evitando-se superestimar, em possíveis casos de lesões focal ou multifocal.

Avaliou-se a hiperplasia dos ductos biliares conforme a formação de pregas no epitélio tubular, o número e o volume destas pregas além da redução do lúmen tubular. Por fim, avaliou-se o grau de infiltração periportal de células inflamatórias contabilizando-se apenas a infiltração de granulócitos e não considerando a presença de figuras de mitose nestes sítios de infiltração. A estimativa do grau de lesão hepática foi avaliada subjetivamente, atribuindo símbolo (+) para quantificar o conjunto de lesões dos itens (necrose e vacuolização dos hepatócitos, infiltração de células inflamatórias e hiperplasia dos ductos biliares), onde (+) representa a ausência de lesão e (++++) o grau máximo de lesão detectável, conforme quadro abaixo.

Quadro 1 – Escore histopatológico de acordo com o grau de lesões hepática.

| ESCORE | LESÃO |
|--------|----------|
| + | leve |
| ++ | moderado |
| +++ | severo |
| ++++ | intenso |

Os vinte cortes histológicos dos fígados foram separados em quatro grupos, sendo cada grupo constituído de 5 lâminas com graus de lesões similares, de acordo com o escore atribuído.

3.5- Extração de DNA total

A extração foi realizada através da reação com material bruto (200µl de suspensão de vacina ou volume equivalente de tecido macerado) com três volumes (600µl) de iodeto de sódio (NaI) sob aquecimento a 55°C e leve agitação por 15min.

O material obtido foi então submetido à centrifugação por 2 minutos a 14000g a temperatura ambiente e o sobrenadante coletado com o auxílio de uma pipeta.

A seguir, foram adicionados à mistura 50µl de suspensão de sílica e a nova mistura foi homogeneizada com o auxílio de um vortex. A mistura foi incubada em agitador *end-over-end* (Speci-Mix, Thermolyne) por 10 minutos a temperatura ambiente. Após centrifugação por 30 segundos a 14000g a temperatura ambiente, o sobrenadante foi descartado por inversão do tubo.

O sedimento foi ressuscitado em 1ml de NaI e rapidamente homogeneizado com o auxílio de um vortex. A mistura foi centrifugada por 30 segundos a 14000g a temperatura ambiente e o sobrenadante descartado por inversão do tubo.

O sedimento foi lavado duas vezes com 1ml de tampão de lavagem (Etanol 50%, 50mM Tris-HCl pH 8,0, 10mM EDTA pH 8,0). Após centrifugação por 30 segundos a 14000g a temperatura ambiente, todo o tampão de

lavagem foi removido com o auxílio de uma pipeta. Então, adicionou-se 1ml de acetona *pro analisi* e, após homogeneizado no vortex, foi centrifugado por 30 segundos a 14000g a temperatura ambiente, o sobrenadante foi descartado e o resíduo de acetona evaporado do sedimento em tubo com tampa aberta mantido a 56°C por 10 minutos.

O DNA aderido à sílica foi eluído por adição de 50µl de TE (5 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,5 mM EDTA pH 8,0), incubado a 56°C por 5 minutos e o tubo centrifugado por 30 segundos a 14000g a temperatura ambiente para solidificar o sedimento. O sobrenadante foi removido com o auxílio de uma pipeta e estocado em freezer a -20°C.

3.6- Determinação espectrofotométrica da concentração de DNA

As amostras de DNA extraídas foram analisadas e quantificadas por leitura em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000. Este aparelho permite a análise e quantificação de amostras de ácido nucléicos utilizando 2 µl da amostra de interesse. É ligado a um computador que analisa os dados enviados pelo aparelho e estima a quantidade de DNA na amostra em ng/µl e a qualidade do material pelo valor obtido na razão DO_{260nm}/DO_{280nm} .

3.7- Reação em cadeia pela polimerase

3.7.1-Aviadenovirus

O DNA total de cada amostra foi empregado como molde para a amplificação de parte do genoma de *Aviadenovirus*. O FAdV-1, estirpe Plelps, foi usado como controle positivo em cada reação. Foram utilizados os primers de acordo com Meulemans *et al.* (2001).

F: 5'- (CAA GTT CAG GCA GAC GGT)-3'
R: 5'- (TAG TGA TGC CGC GAC ATC AT)-3'

Uma alíquota de 1µl de cada amostra de DNA total foi utilizada como molde na reação de amplificação, com volume final de 50µl contendo: 100ng de DNA, 10µl de

tampão 5X (200mM Tris-HCl pH8,4, 500mM KCl – Invitrogen), 3µl de dNTP a 10mM (dATP, dTTP, dCTP e dGTP - Invitrogen), 5µl de MgCl₂ a 50mM (Invitrogen), 1µl de cada primer a 125pmol, 0,2µl de Taq Polimerase a 5U/µl (*Platinum Taq DNA Polymerase* – Invitrogen) e água ultra pura q.s.p.

A reação de PCR específica foi realizada em termociclador (Axygen - Maxygene). As condições de amplificação foram de um ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 2 minutos, anelamento a 60°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto, além de uma extensão final a 72°C por 2 minutos.

3.7.2- Anemia infecciosa das galinhas

O DNA total das amostras foi empregado como molde para a amplificação de parte do genoma do vírus da anemia infecciosa das galinhas. Como controle positivo foi utilizada a vacina comercial AviPro Thymovac da empresa *Lohman Animal Health*. Foi utilizado o oligonucleotídeo sugerido por Cardona *et al.* (2000).

O3F 5'-(CAA GTA ATT TCA AAT GAA CG)-3'
O3R 3'-(TTG CCA TCT TAC AGT CTT AT)-

Uma alíquota de 1µl de cada amostra de DNA total foi utilizada como molde na reação de amplificação, com volume final de 50µl contendo: 200ng de DNA, 5µl de tampão 10X (200mM Tris-HCl pH8,4, 500mM KCl – Invitrogen), 1µl de dNTP a 10mM (dATP, dTTP, dCTP e dGTP - Invitrogen), 1,5µl de MgCl₂ a 50mM (Invitrogen), 1µl de cada primer a 10pmol, 0,2µl de Taq Polimerase a 5U/µl (*Platinum Taq DNA Polymerase* – Invitrogen) e água ultra pura q.s.p.

A reação de PCR específica foi realizada em termociclador (Axygen - Maxygene). As condições de amplificação foram de um ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 45°C por 2 minutos e

extensão a 72°C por 1 minuto, além de uma extensão final a 72°C por 10 minutos.

3.8- Eletroforese em gel de agarose

A visualização dos resultados das ampliações foi realizada por eletroforese em gel de agarose. Em cada 8µl do produto amplificado, foram adicionados 2µl do tampão corante de amostra (60% de glicerol, 10% de TBE 10X e azul de

bromofenol) na concentração de 5X, e essa mistura foi aplicada em gel de agarose a 2%. A eletroforese ocorreu a 100V em tampão TBE 0,5X (100mM Tris-base pH8,3, 25mM EDTA e 50mM ácido bórico), utilizando o padrão molecular de 100 pb DNA Ladder (Invitrogen). Posteriormente à corrida, o gel foi corado com solução de brometo de etídeo na concentração de 0,5µg/ µl e os resultados revelados com o auxílio de um transiluminador UV.

CAPÍTULO I - DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE AVIADENOVIRUS NA AVICULTURA INDUSTRIAL

RESUMO

Para este estudo foram coletados fígados de 50 poedeiras e de 300 frangos de corte, além de 25 fígados e 25 amostras de fezes de matrizes pesadas, representativos das principais regiões avícolas do estado. A pesquisa para detecção de CAV, realizada em quatro pool, constituídos de 10 amostras de fígados de frangos de cada lote, foi negativa. Através de PCR foi demonstrada a presença de DNA de FAdV em 100% (25/25) das poedeiras adultas e em 36% (9/25) das pintainhas. As fezes de matrizes foram negativas para a presença do vírus, no entanto, foi detectada a presença em 4/25 através do fígado dessas aves. Em frangos de corte a positividade variou de 24-86% entre os lotes estudados. No entanto, não foi possível estabelecer correlação entre a amplificação do genoma de FAdV com as lesões histopatológicas encontradas nos fígados. Embora o nível de detecção do genoma viral tenha variado significativamente entre os lotes estudados, a circulação da infecção de FAdV na avicultura industrial mineira foi considerada alta. Essa variação observada em aves adultas se traduz, principalmente, no grau de rigidez dos programas de biossegurança aplicados nas unidades produtoras e, não menos importante, a presença de anticorpos maternos neutralizantes nas aves jovens.

1. INTRODUÇÃO

Ressalta-se que a avicultura brasileira é reconhecida hoje como das mais desenvolvidas do mundo, com índices de produtividade realmente excepcionais. Atingimos esse patamar graças a programas de qualidade implementados em todos os elos da cadeia nos últimos anos, com destaque para genética, nutrição, manejo, biossegurança, boas práticas de produção, rastreabilidade e programas de bem-estar animal e de preservação do meio ambiente.

A biossegurança, em avicultura, objetiva a proteção das aves contra agentes infecciosos ou não capazes de induzir doença. De uma maneira geral, a implementação de procedimentos de biossegurança visam evitar a possibilidade de entrada de agentes infecciosos em áreas de produção avícola industrial e, conseqüentemente, evitar a disseminação de doenças e/ou mantê-las sob controle.

O impacto econômico das doenças para a avicultura, pode ser crucial para a manutenção do negócio, resultando em elevadas perdas por mortalidade, redução dos resultados de desempenho, aviários vazios durante quarentena, comprometimento da evolução da atividade, imposição de barreiras sanitárias e redução de vendas de produtos, etc.

A importância da ausência de agentes patogênicos na avicultura industrial é óbvia, contudo a criação dessas aves livres desses agentes é impraticável. Contudo, a redução da carga infecciosa é fator determinante para assegurar o bom desempenho do lote. Assim, o conhecimento dos vírus que causam doenças em aves comerciais, assim como o entendimento da sua imunologia, patogenia e epidemiologia são necessários para o desenvolvimento de adequados procedimentos de controle.

A inexistência de dados epidemiológicos acerca de *Aviadenovirus* no Brasil foi o motivo de interesse para este trabalho. Como ponto de partida, pretendeu-se conhecer a ocorrência do vírus na população avícola industrial do Estado de Minas Gerais.

2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A amostra foi considerada positiva para a presença da seqüência de DNA de *Aviadenovirus* quando um fragmento de 897 pares de base foi visualizado em gel de agarose com iluminação ultravioleta

(Meeulemans *et al.*, 2001). A PCR utilizada neste estudo foi capaz de detectar o segmento genômico do vírus até a diluição de 10^{-9} da solução de trabalho do controle positivo. A detecção de quantidades mínimas de DNA possibilita que o genoma viral seja amplificado diretamente de amostras de campo, evitando assim o passo extra da necessidade de replicação do vírus em cultivo celular. A alta sensibilidade do método pode ser importante em diagnóstico de casos subclínicos ou infecções latentes.

Entretanto, apenas em fígado foi possível a detecção de FAdV, não sendo detectado em amostras de fezes. Não foi observada amplificação do genoma de *Atadenovirus* com a amostra vacinal contra a Síndrome da Queda de Postura (EDS-76), estirpe V-127 (Fort Dodge).

A presença de DNA de FAdV variou amplamente entre os lotes com as mesmas e diferentes finalidades de produção (Tabela 1).

Tabela 1 – Resultados da PCR de acordo com as finalidades de produções avícolas industriais e a proporção de aves positivas para FAdV dentro de cada lote avaliado.

| Finalidade de produção | Idade/dias | Espécime | Positividade | Porcentagem |
|----------------------------|------------|----------|--------------|-------------|
| Matriz pesada (48 semanas) | 336 | Fígado | 4/25 | 16% |
| Matriz pesada (62 semanas) | 434 | Fezes | 0/25 | 0% |
| Poedeira | 18 | Fígado | 9/25 | 36% |
| Poedeira (78 semanas) | 546 | Fígado | 25/25 | 100% |
| Frango de corte 1 | 42 | Fígado | 30/50 | 66% |
| Frango de corte 2 | 47 | Fígado | 43/50 | 86% |
| Frango de corte 3 | 44 | Fígado | 36/50 | 72% |
| Frango de corte 4 | 44 | Fígado | 12/50 | 24% |
| Frango de corte 5 | 42 | Fígado | 35/50 | 70% |
| Frango de corte 6 | 39 | Fígado | 39/50 | 78% |

A maior proporção de positividade para o DNA viral foi constatada em poedeiras comerciais em final de produção (25/25), enquanto em pintainhas de 18 dias de idade foi inferior (12/25). A totalidade de aves infectadas na fase adulta pode ser traduzida pelas práticas de manejo peculiares praticadas nesta unidade de produção estudada. A proximidade entre os lotes, múltiplas idades de criação, alta densidade populacional, falta de higiene, entre outras, são fatores predisponentes que contribuem para a perpetuação e disseminação de agentes infecciosos. A menor taxa de infecção das pintainhas comparada com as galinhas adultas poderia ser explicada pela presença de anticorpos maternos neutralizantes durante aproximadamente 2 a 4 semanas de idade, assim as aves

estariam teoricamente protegidas da reativação viral nesse período (McFerran e Smyth, 2000).

Não foi possível a detecção do genoma de FAdV nas amostras de fezes de matrizes, sendo propostas três hipóteses para esses resultados: 1) baixa expressão viral nas galinhas na época da colheita de material, 2) baixa amostragem e 3) infecção latente. É improvável que os resultados negativos sejam devido ao desempenho da PCR, tendo em vista a alta sensibilidade demonstrada pelos testes de diluições decimais, até 10^{-9} do material de referência positiva. Contudo, a possibilidade da carga viral na amostra de fezes estar abaixo do limite de detecção do teste, não pode ser descartada. É também possível que o

tamanho da amostra não tenha sido suficientemente grande para a detecção das poucas amostras positivas.

Embora um dos principais locais de replicação de vírus FAdV sejam os tratos respiratório e digestivo (MacFerran *et al.*, 1977), após um período de excreção, o vírus parece tornar-se latente, presumivelmente devido ao desenvolvimento de imunidade. Quando a imunidade é perdida, seja naturalmente por vias metabólicas ou agentes imunodepressores e, igualmente durante o período de pico de produção de ovos, o vírus é reativado e ocorreria excreção. A reativação viral garante alta excreção de vírus no ambiente, além da possibilidade de transmissão vertical para a próxima geração através do ovo (McFerran e Smyth, 2000). A detecção de FAdV dessas mesmas matrizes só foi possível pela extração de DNA viral de fígado (4/25).

A detecção de DNA amplificado nos fígados de frangos de corte variou de 24 a 86% entre os lotes estudados. Os produtos da PCR de alguns dos fígados mostraram sinais mais fortes que outros. Essa observação também foi relatada por Grgic *et al.* (2006). Contudo, a diferença em intensidade não pode ser interpretada como variação de carga viral entre os órgãos, uma vez que este teste não foi desenhado para ser quantitativo.

Por não ser conhecido o histórico nem o perfil de infecção de FAdV nos progenitores desses frangos, não é possível obter uma conclusão acerca dessa infecção. Esse nível de infecção diferenciado revela a ampla complexidade em relação à circulação da infecção de FAdV entre lotes criados em diferentes regiões do estado de Minas Gerais. Considerando como fonte de infecção a via transovariana, os lotes de frangos poderiam receber uma carga viral diferenciada de acordo com o estágio de produção de ovos ou possível período de doença imunodepressora nas matrizes. Por outro lado, a infecção horizontal abrange uma ampla variedade de meios de infecção, todos eles baseados na implementação de práticas de biossegurança. Deficiência em

procedimentos de limpeza, especialmente a desinfecção das granjas e equipamentos, associados a alta resistência de FAdV, permite uma carga infecciosa residual que pode infectar as aves ao longo do processo de produção. Assim como, devem ser consideradas fontes alternativas de infecção, tais como a presença de outras aves próximas às unidades produtivas. De acordo com os resultados do estudo de Akhtar *et al.* (1992), o principal fator de risco na introdução de FAdV nas granjas foi associado com as equipes de vacinação. Uma prática que vem sendo adotada com maior frequência pelas grandes companhias de produção de frangos de corte.

Sob condições de campo o FAdV não é altamente contagioso dentro de um lote (Cook, 1970). Esse autor observou que o vírus levaria semanas para infectar um lote de aves, e essa lenta disseminação foi observada em lotes infectados naturalmente (Van Eck *et al.*, 1976). Isso provavelmente porque a transmissão lateral não é um método eficiente de disseminação. Contudo, sob condições naturais e, especialmente se infecções concorrentes estão presentes, a disseminação em um lote pode ser muito rápida (MacFerran *et al.*, 1977).

Em concordância com a literatura (Rebel *et al.*, 2006), o lote de frangos de corte do qual mais se amplificou o genoma de FAdV foi exatamente o lote de número 2, o qual foi acometido pela síndrome da má absorção. O alimento constitui um dos maiores investimentos no lote e, deficiências na sua utilização são traduzidas num significativo impacto econômico. Várias doenças entéricas são usualmente acompanhadas pela cessação na ingestão de alimentos. Outras doenças, no entanto, afetam o crescimento enquanto as aves continuam consumindo o alimento, refletindo-se deste modo, em perdas por parte do produtor, além das causadas pela falta de uniformidade das aves, o que faz difícil o mercado do produto final (Barnes, 1997). Uma grande variedade de agentes infecciosos pode afetar o trato gastrointestinal das aves. Contudo, os vírus são os mais comumente implicados na maioria das infecções que têm grande

impacto na sanidade da ave e na performance do lote. Estes incluem rotavírus, coronavírus, enterovírus, astrovírus, reovírus e adenovírus.

Os resultados de PCR para o estudo de possível infecção nestas aves com o agente da anemia infecciosa das galinhas foram negativos. Entretanto, foram considerados inconclusivos, visto que o material disponível para a extração de vírus, no caso fígado, não seria o órgão eleito para a sua detecção.

Embora, a simples detecção do vírus CAV em galinhas pareça não determinar o possível grau de lesões causadas pelo FAdV, de acordo com estudo prévio (Toro *et al.*, 2000), a susceptibilidade de galinhas à doença clínica pelo FAdV é dependente da dinâmica cronológica da co-infecção por CAV.

Neste estudo a taxa de detecção de FAdV na avicultura industrial pode ser considerada alta. Contudo, a detecção poderia ser ainda maior com a avaliação concomitante de outros órgãos, além de fígado. De acordo com os resultados de Grgic *et al.* (2006), a detecção de DNA de FAdV amplificado por PCR em vísceras de pintos de um dia de idade, pode variar segundo o órgão analisado. Assim, os autores foram capazes de detectar o DNA do vírus em amostras de rins, fígado, bolsa cloacal e baço em 18%, 25%, 25% e 28%, respectivamente. Interessante neste estudo foi que, apesar da não detecção de FAdV em algumas amostras de fígado houve amplificação do genoma viral em outro(s) órgão(s) da mesma ave.

A alta ocorrência de FAdV em aves na avicultura industrial de Minas Gerais deverá demandar muito esforço e custo para a implantação de estratégia de erradicação. Outrossim, de nada valerão estes esforços e investimentos enquanto não houver a erradicação do agente nos plantéis reprodutores, tendo em vista a transmissão vertical e horizontal.

Histopatologia

Na avaliação histopatológica dos fígados de aves industriais não foi encontrado corpúsculo de inclusão intranuclear e as lesões microscópicas variaram significativamente.

Apesar da presença de corpúsculo de inclusão intranuclear nos hepatócitos de aves acometidas pelo FAdV ser considerado diagnóstico sugestivo de hepatite por corpúsculo de inclusão, infecções experimentais mostram resultados diferentes. Nos estudos de Toro *et al.* (1999), galinhas que foram inoculadas experimentalmente com FAdV-4, morreram 6 dias pós-infecção (PI) e apresentaram severa hepatite com grandes corpúsculos de inclusão intranuclear basofílicos. No entanto, nas demais aves sobreviventes e necropsiadas 10 dias PI foram observadas apenas discretas lesões no fígado e ausência de corpúsculo de inclusão. Como o corpúsculo é resultante do excesso de síntese viral requerido para a montagem de partículas virais, a sua ausência sugere a não replicação de FAdV no fígado no momento avaliado.

Embora as lesões microscópicas encontradas tenham sido similares àquelas descritas nos fígados de galinhas infectadas naturalmente e diagnosticadas com hepatite por corpúsculo de inclusão (Gallina *et al.*, 1972), não foi possível estabelecer uma correlação das lesões com a detecção do genoma de FAdV. O conjunto de lesões encontradas em um fígado com detecção do genoma viral pela PCR, também foi observado naqueles que não foi amplificado o DNA viral.

A fim de se tentar um diagnóstico morfológico nos fígados avaliados, os mesmos foram separados em grupos de acordo com o conjunto de lesões encontrado (sumarizados no quadro 2). Assim, observou-se que em 14/375 amostras o diagnóstico morfológico foi colângio-hepatite heterofílica multifocal. Nesses fígados haviam lesões com severidade leve, moderada ou acentuada, infiltrados heterofílicos (ou, em menor

intensidade, linfo-histiocitários) periportais estendendo-se ao parênquima hepático. Hiperplasia de ductos biliares e discreta necrose multifocal foram observadas associada a essa lesão. Em 14/375 amostras havia pericolangite heterofílica multifocal constituída por acentuado infiltrado periportal heterofílico, necrose multifocal leve e hiperplasia de ductos biliares de leve a acentuada. Bilestase ductal, degeneração gordurosa e hemorragia multifocal leve foram ocasionalmente vistas.

Apesar de não serem específicas, colangio-hepatite e pericolangite heterofílicas são lesões sugestivas de infecção por *Clostridium perfringens* em frangos de corte

(Ivanov, 2009). A manipulação da dieta e a natureza da ração das aves podem afetar a população intestinal de *Clostridium perfringens*, favorecendo a emergência de enfermidades associadas a essa bactéria em frangos (Wages e Opengard, 2003).

Em 38/375 fígados observaram-se hepatite necrosante de distribuição aleatória associada a fibrina, infiltrados heterofílicos, sugestiva de hepatite bacteriana (Ivanov, 2009). Necrose multifocal leve associada à microtrombose sinusoidal foi observada em 9 destas 38 amostras. Esses achados não são patognomônicos, mas muito sugestivo de infecção aguda por *Escherichia coli* (Ivanov, 2009).

Quadro -2- Resultados da histopatologia de fígados de matrizes pesadas, poedeiras e frangos de corte

| Quantidade | Diagnóstico morfológico |
|------------|--|
| 14 | Colângio-hepatite heterofílica multifocal |
| 9 | Degeneração e/ou necrose hepatocelular centrolobular |
| 38 | Hepatite necrosante aleatória |
| 3 | Hepatite necrosante aleatória com bactérias basofílicas intralesionais |
| 32 | Hepatite necrosante aleatória com microtrombose sinusoidal |
| 14 | Pericolangite heterofílica multifocal |
| 3 | Peri-hepatite fibrinosa subaguda difusa acentuada |
| 29 | Outras alterações |
| 233 | Sem alterações |

Em 3/375 amostras, observaram-se peri-hepatite fibrinosa subaguda difusa acentuada caracterizada por espessamento do saco hepatoperitonal e da cápsula hepática em consequência de depósitos de fibrina em organização, heterófilos, linfócitos e macrófagos, compatível com colicepticemia (Ivanov, 2009).

Em 9/375 fígados, observaram-se alterações compatíveis com lesão de hipóxia, com achados microscópicos de lesão aguda e crônica, indicativas de

hipóxia secundária à insuficiência cardíaca direita (Ivanov, 2009).

Em 29/375 amostras, observaram-se alterações microscópicas inespecíficas ou sem significado clínico, tais como congestão e hemorragias multifocais, deposição de glicogênio nos hepatócitos, bilestase ductal e degeneração gordurosa.

De acordo com as avaliações realizadas pode-se verificar o predomínio de lesões devidas a infecções bacterianas.

CAPÍTULO II - OCORRÊNCIA DE AVIADENOVIRUS NA AVICULTURA DE SUBSISTÊNCIA

RESUMO

Objetivou-se avaliar a ocorrência de FAdV na avicultura de subsistência, onde foram coletados 12 fígados de galinhas em duas propriedades rurais próximas a unidades produtoras de frangos de corte. A detecção de DNA amplificado foi observada em 100% (12/12) dos fígados, porém, corpúsculo de inclusão intranuclear nos hepatócitos dessas galinhas não foi observado. As práticas de manejo aplicadas nestas produções, associada à presença de diferentes espécies aviárias criadas em consórcio, explicam a totalidade de galinhas infectadas com FAdV. Como estas galinhas são criadas em região onde a avicultura industrial é expressiva, falhas de biossegurança podem permitir o escape de agentes patogênicos, bem como sua entrada nos sistemas de produção, eventos que podem ser favorecidos pelas características do FAdV ser um vírus não envelopado e extremamente resistente no ambiente.

1. INTRODUÇÃO

O sistema de produção intensivo de aves contribui sobremaneira para o suprimento de proteínas de alto valor biológico a preços competitivos, além de atender satisfatoriamente a demanda do consumidor. No entanto, uma parcela desse mercado tem demonstrado interesse em consumir alimentos com características diferenciadas.

A produção orgânica, que começou no âmbito quase que exclusivo da produção, atualmente atinge os consumidores e apresenta uma demanda crescente. O termo "consumo consciente" torna-se cada vez mais comum e evoca um consumidor que compra produtos que julga serem produzidos sob condições que preservam o meio ambiente e que são pautadas pela responsabilidade social.

Recentemente, o Mapa aprovou o Decreto Nº. 6.323/dezembro de 2007, que disciplina as atividades pertinentes ao desenvolvimento da agricultura orgânica, definidas pela Lei Nº 10.831, de 23 de dezembro de 2003, que abrange os sistemas denominados: ecológico, biodinâmico, natural, sustentável, regenerativo, biológico, e orgânico. Com base nas normativas vigentes, entende-se que a produção orgânica de aves deve estar, necessariamente, adequada às diretrizes do sistema de produção orgânico, sem comprometer as normativas de biossegurança determinadas para a avicultura nacional.

Os procedimentos operacionais para a produção de aves no Brasil estão contemplados no Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Ressaltando-se as normas técnicas para registro, fiscalização e controle de estabelecimentos avícolas de reprodução e comerciais, de corte e postura, além das normativas específicas para controle das doenças como salmonelose, micoplasmose e doença de Newcastle e para a prevenção da influenza aviária.

Contudo, esse tipo de criação é formado por pequenos produtores que não utilizam práticas de biossegurança em suas criações, as aves são mantidas livres ou semi confinadas a fim de otimizar o uso de recursos naturais, tendo por objetivo a auto-sustentação. A criação normalmente é realizada em consórcio com outras espécies de aves de diferentes origens e idades, e não é contemplada com uma alimentação balanceada nem vacinação. Além disso, é fundamental para a adoção desse sistema, a ausência do emprego dos insumos artificiais, como aditivos e/ou estimulantes e medicamentos.

Portanto, no sistema orgânico de criação de aves, as condições menos agressivas de produção e a característica de rusticidade atribuída a essas aves não eliminam os riscos de ocorrência de doenças no plantel. Baseado nessa premissa e com o objetivo de conhecer melhor a circulação de FAdV no Estado Minas Gerais, propôs-se neste trabalho averiguar a ocorrência do vírus em criações de galinhas de subsistência.

2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as 12 amostras de fígados de galinhas de subsistência testadas amplificaram o produto de tamanho molecular esperado para FAdV. Em contraste, não foi observado corpúsculo de inclusão intranuclear nos hepatócitos dessas aves.

Em ambientes de avicultura de subsistência não são usualmente praticáveis procedimentos de desinfecção e de estratégias de biossegurança. Essa realidade, associada à condição de múltiplas origens e idades de galinhas e outras espécies de aves dividindo o mesmo ambiente, facilitam a manutenção de grande diversidade de patógenos primários e oportunistas no local.

A rusticidade das galinhas de subsistência pode resultar do processo de seleção natural, em que as forças seletivas são os desafios infecciosos, parasitários e nutricionais, onde sobrevivem e reproduzem as aves resistentes a esses desafios, em contraste à seleção direcionada para a produção na avicultura industrial, com perdas em resistência (rusticidade). Com este raciocínio poderia ser considerado que galinhas industriais sofrem, possivelmente, maior impacto da infecção por FAdV. Assim, embora o vírus presente nas aves do estudo poderia contribuir para parte do comprometimento sanitário, estas poderiam, por sua maior rusticidade, abrigar infecções subclínicas importantes.

Como estas galinhas são criadas em região onde a avicultura industrial é expressiva,

falhas de biossegurança podem permitir o escape de agentes patogênicos, bem como sua entrada nos sistemas de produção, eventos que podem ser favorecidos pelas características do FAdV ser um vírus não envelopado e extremamente resistente no ambiente.

O FAdV apresenta elevada resistência à grande maioria dos tratamentos normalmente empregados na limpeza e desinfecção, permitindo que o vírus persista por longos períodos nas instalações e seja facilmente veiculado por fômites contaminados (MacFerran e Adair, 1977). O FAdV pode provocar infecção persistente e ter sua eliminação intermitente em indivíduos infectados (Grgic *et al.*, 2006, Philippe *et al.*, 2007). Isso associado a um sistema de manejo sem limpeza, desinfecção e vazios sanitários, mantém a contaminação ambiental.

A criação de aves de diferentes idades no mesmo ambiente aumenta o risco de infecção, já que permite a transmissão e circulação de FAdV entre lotes e o aquecimento do vírus, pois sempre são introduzidas aves susceptíveis à infecção. Ciclos repetidos de replicação viral podem acarretar mutações pontuais no genoma do agente, favorecendo o surgimento de estirpes de diferentes patogenicidades.

Não se conhece a condição sanitária da avicultura de subsistência para FAdV no Brasil. Porém, a literatura científica sugere que o FAdV é onipresente na população avícola e, possivelmente, todas as espécies aviárias são susceptíveis à infecção (Adair e Fitzgerald, 2008).

Assim, considera-se o resultado de alta relevância, tendo em vista o risco de infecção representado por falhas de biossegurança nestas propriedades, o que permita a transferência de vírus entre as criações, podendo favorecer a perpetuação das infecções por *Aviadenovirus* em uma região.

CAPÍTULO III - DETECÇÃO DO GENOMA DE AVIADENOVIRUS EM VACINAS AVÍCOLAS COMERCIAIS

RESUMO

Diferentes estudos relatam a infecção de plantéis de aves SPF infectados com FAdV, embora mantidos em um rígido programa de biossegurança. Diante dessa premissa objetivou-se investigar através de PCR as vacinas avícolas vivas liofilizadas fabricadas na década de 90 e atuais para avaliar uma possível contaminação de FAdV e estabelecer a potencial correlação entre a presença do vírus em imunobiológicos e sua distribuição na avicultura mineira. Para tanto, foram avaliadas 15 vacinas avícolas comerciais produzidas por diferentes laboratórios entre 1991 e 2005. O FAdV foi detectado em três vacinas produzidas pelo mesmo fabricante em ovos SPF embrionados, sendo duas vacinas contra a doença de Newcastle (1991 e 1992) e uma de encefalomielite aviária (1994) e em nenhuma da década atual. A detecção de FAdV em vacinas vivas comerciais sugere importante papel destas na epidemiologia do vírus, tanto para a avicultura industrial como da avicultura de subsistência, contribuindo para a disseminação e manutenção do agente dentro das unidades de produções avícolas.

1. INTRODUÇÃO

Os requerimentos técnicos específicos para a produção, o controle e o uso de vacinas e diluentes para uso na avicultura brasileira, têm como base legislativa a Instrução Normativa Nº 7, de 10 de Março de 2005, e a Portaria Nº 138, de 5 de junho de 2006 do MAPA (Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento), que definem os aspectos relacionados às ações de registro, fiscalização e controle de Estabelecimentos Avícolas Produtores de Ovos e Aves SPF (do inglês *Specific Pathogen Free* - Livres de Patógenos Específicos).

O estabelecimento avícola de aves e ovos SPF deverá manter registro dos procedimentos de monitoração sanitária, de cada lote de aves ou ovos incubáveis, referentes às doenças contempladas no Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA). Estes exames deverão ser realizados obrigatoriamente, em laboratório oficial ou credenciado pelo MAPA. Os lotes de aves produtoras de ovos SPF devem estar livres da infecção de *Aviadenovirus* e anticorpos específicos, dentre outras.

O monitoramento sorológico definido pelo MAPA realizado em plantéis avícola SPF para a possível detecção de anticorpos contra o FAdV são realizados pelos testes de imunodifusão em ágar gel e vírus neutralização. Contudo, diferentes estudos detectaram FAdV em plantéis de aves SPF que eram mantidos em um programa rígido de biossegurança. Portanto, diante dessa informação pretendeu-se investigar através de PCR as vacinas fabricadas na década de 90 e atuais de diferentes empresas para avaliar uma possível contaminação de FAdV.

2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A investigação da possível contaminação de vacinas avícolas através da detecção do genoma de FAdV foi constatada. Tratam-se de duas vacinas contra a doença de Newcastle e uma de encefalomielite aviária, fabricadas em 1991, 1992 e 1994, respectivamente (quadro 3).

Todas as vacinas examinadas foram produzidas com insumos de galinhas SPF, em embriões ou em cultura de células (fibroblastos) cultivadas *in vitro* para a replicação viral. A amplificação do genoma de FAdV foi detectada em três vacinas replicadas em ovos SPF embrionados.

Quadro 3 – Pesquisa de detecção do segmento de DNA de FAdV pela técnica de PCR em vacinas avícolas vivas liofilizadas.

| Mês/ ano | Vacina | Laboratório | Resultado |
|----------|-----------------|-------------|-----------|
| Jan/91 | Newcastle | L1 | positivo |
| mai/92 | Newcastle | L1 | positivo |
| Jan/94 | Encefalomielite | L1 | positivo |
| Fev/96 | Marek | L2 | negativo |
| jul/96 | Marek | L3 | negativo |
| Dez/91 | Bronquite | L3 | negativo |
| Dez/92 | Bronquite | L2 | negativo |
| Jan/95 | Bouba aviária | L5 | negativo |
| Set/97 | Bronquite | L2 | negativo |
| Nov/98 | Gumboro | L2 | negativo |
| Set/01 | Bronquite | L6 | negativo |
| Fev/02 | Bronquite | L4 | negativo |
| jul/04 | Newcastle | L1 | negativo |
| Jun/05 | Newcastle | L4 | negativo |
| Ago/05 | Encefalomielite | L5 | negativo |

De acordo com os resultados apresentados no Quadro 3, a contaminação de vacinas vivas comerciais foi confirmada até 1994 no Brasil. Vacinas elaboradas a partir dessa data não apresentaram contaminação por FAdV detectável na PCR, inclusive as vacinas produzidas pelo mesmo laboratório previamente positivo, indicando uma melhora sanitária dos plantéis SPF. A grande transformação no mercado de vacinas, com a entrada de novas empresas e incorporações, podem ter promovido maior dinamismo e modernização ao setor.

O registro, fiscalização e controle de Estabelecimentos Avícolas Produtores de Ovos e Aves SPF, a certificação e registro de imunobiológicos, incluindo os procedimentos de diagnóstico, passaram no Brasil por normalização que exigiu adequação de empresas envolvidas na elaboração e fabricação de vacinas. Estas legislações estão alinhadas com os mais recentes protocolos e tendências (OIE - *Office International des Epizooties* - Organização Mundial de Saúde Animal), sendo similares aos exigidos nos programas de certificação mais disseminados em âmbito internacional.

Com os novos métodos de diagnóstico, contemplados por testes altamente sensíveis e específicos, possivelmente, erradicou o FAdV dos plantéis SPF. Obviamente, com a possibilidade de galinhas apresentarem infecção latente e por transmitirem verticalmente o vírus, torna-se fundamental o monitoramento regular destes plantéis para FAdV. Cook (1974) revelou o isolamento de FAdV em ovos não inoculados e que o lote de galinhas SPF produzindo esses ovos infectados mostrou produção de ovos e eclodibilidade excepcionalmente altas.

Os testes diagnósticos determinados pelo MAPA para o monitoramento sorológico em plantéis avícola SPF para a possível detecção de anticorpos contra o FAdV são os testes de imunodifusão em ágar gel e vírus neutralização, onde são avaliadas 60 aves mensal e 40 aves semestralmente.

O teste de vírus neutralização é o método sorológico disponível mais sensível para detectar a infecção de FAdV, contudo é tipo específico, caro e demorado. Muitos trabalhos foram conduzidos com o teste de imunodifusão em ágar gel. O teste é barato, simples e todos os sorotipos reconhecidos

compartilham antígenos precipitantes em comum. No entanto, Fadly *et al.*, (1980), demonstraram que a utilização desse teste no monitoramento de um lote de galinhas SPF, não detectou a infecção de FAdV por pelo menos uma geração.

De acordo com Shane (1996), o vírus responsável pela síndrome da hepatite/hidropericárdio, FAdV sorotipo 4, pode ter sido introduzido na avicultura comercial do

Paquistão através de vacina viva contra a doença de Newcastle.

A contaminação por FAdV nas vacinas pode ser entendida por, pelo menos, três explicações: (1) ausência de monitoramento constante da infecção nos reprodutores SPF, (2) monitoramento deficiente para detecção de infecção latente e (3) inexistência de controle de qualidade na produção de vacinas.

CAPÍTULO IV - MICOTOXINA ASSOCIADA COM INFECÇÃO DE AVIADENOVIRUS

RESUMO

Além de intoxicação, a frequência da contaminação dos produtos de consumo e a exposição crônica das aves por essas toxinas podem significar imunodepressão humoral e celular. Diante do potencial imunodepressor, objetivou-se quantificar as aflatoxinas (B1, B2, G1 e G2) nos fígados de um lote de frangos de corte (n=20) e, paralelamente realizar um estudo histopatológico a fim de se tentar relacionar a detecção analítica da micotoxina com a infecção de FAdV. A quantificação de aflatoxinas por cromatografia em camada delgada com limite inferior de detecção de 2ppb foi negativa. Assim como, não foi possível estabelecer uma correlação entre a infecção de FAdV e as lesões histopatológicas no fígado. Contudo, foi observada uma detecção do DNA viral relativamente crescente de acordo com o aumento das lesões histológicas causadas por outras micotoxinas. Portanto, o grau de lesão causado por aflatoxina sugere favorecer a infecção por FAdV.

1. INTRODUÇÃO

As aflatoxinas são amplamente incriminadas como contaminantes naturais dos alimentos. Quanto à sua composição química, as aflatoxinas são metabólitos tóxicos produzidos pelos fungos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus nominus*. O grupo das aflatoxinas compreende as toxinas B1, B2, G1 e G2, das quais a B1 é a predominante e também a mais tóxica. As aflatoxinas recebem a designação B ou G devido a propriedade de emitirem coloração azul (blue – B) ou verde-azulada (green – G) sob luz ultra violeta. Os seres humanos e vários animais domésticos são sensíveis aos seus efeitos tóxicos que podem ser agrupados como: agudos, mutagênicos, carcinogênicos, teratogênicos e imunodepressores.

O uso de alimentos contaminados pela aflatoxina, para a fabricação de rações, tem sido relatado como um problema importante

e com sérias implicações econômicas para a indústria avícola. A ingestão de micotoxinas provocam diversos efeitos sobre a saúde animal, sendo estes sinais dose dependentes, além de sofrerem interferência da espécie, raça, sexo, idade, fatores ambientais, manejo, resultando assim em diferentes graus de intoxicação. O maior problema das micotoxicoses é atribuído aos prejuízos relacionados aos diversos órgãos e sistemas dos animais, implicando na diminuição do seu desempenho zootécnico.

A frequência da contaminação dos produtos de consumo e a exposição crônica das aves por essas toxinas podem significar imunodepressão humoral e celular e afetam o mecanismo de coagulação. Todas estas alterações contribuem para a ocorrência de infecções concomitantes, sobretudo por agentes virais e bacterianos, associados à exposição das aves às rações contaminadas com aflatoxinas.

Após ingestão, as aflatoxinas são absorvidas no trato gastrointestinal e biotransformadas primariamente, no fígado, por enzimas microssomais do sistema de oxidases mistas. O fígado é o órgão alvo da aflatoxicose nas aves.

Atualmente, a metodologia mais específica, precisa e confiável é aquela obtida com o emprego de processos químicos. Esses procedimentos poderão ser tanto os dirigidos para a cromatografia em camada delgada, quanto para a cromatografia líquida de alta resolução. O uso das avaliações químicas ainda constitui as metodologias internacionais mais aceitas e recomendadas para o diagnóstico de micotoxinas.

As características macroscópicas como cor, consistência e volume são utilizados como critério de seleção para a comercialização “in natura” de fígado de aves. Assim, algumas características podem ser consideradas como efeitos primários das aflatoxicoses. A primeira alteração ocorre no

tamanho dos órgãos internos, principalmente do fígado, depois na coloração e textura que os torna amarelados e friáveis. Foi observado que na aflatoxicose aviária ocorrem alterações histopatológicas, com hepatócitos aumentados, além de generalizada proliferação de células nos ductos biliares. A acentuada infiltração de gordura depende da dose e do tempo de intoxicação, chegando o fígado a 68% de aumento. A síntese hepática de gordura e o transporte desta para outras áreas do organismo são seriamente afetados pela ação da aflatoxina B1.

Microscopicamente, Hoerr (1996) descreveu a aflatoxicose hepática aguda como sendo responsável pela degeneração gordurosa, necrose, aumento do núcleo dos hepatócitos com marginalização da cromatina e nucléolo proeminente; observou também rápida proliferação de ductos biliares. A aflatoxicose crônica caracteriza-se microscopicamente pela degeneração dos hepatócitos com a presença de figuras de mitose, a qual pode estar circundada por ductos biliares e tecido fibrinoso.

2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A exposição de pintos a níveis subclínicos de aflatoxina na ração sob um período de

tempo tem mostrado influenciar adversamente a resposta imune e aumento da susceptibilidade a doenças infecciosas (Pier, 1981). Assim como, as micotoxinas são responsáveis por alterações no quadro histológico do fígado das aves e que existe uma relação direta entre a quantidade de aflatoxina ingerida e a intensidade de lesão detectada no fígado (Sandhu *et al.*, 1995).

Sendo assim, criou-se um escore, de forma subjetiva, das lesões microscópicas encontradas nos fígados para averiguar uma possível correlação com os níveis de aflatoxina e a presença de DNA de FAdV nos fígados destas aves. Para tanto, avaliou-se o grau de necrose hepática, grau de vacuolização dos hepatócitos, a intensidade de hiperplasia dos ductos biliares e o grau de infiltração periportal de células inflamatórias. Os vinte cortes histológicos dos fígados, separados em quatro grupos de cinco lâminas, foram classificados de acordo com os graus de lesões. Onde o nível de lesão é mais simples em G1, seguidos em escala crescente por G2, G3, e G4. Após definido os grupos histológicos, foi feito um *pool* de 5 fígados de cada grupo para a quantificação das aflatoxinas. A avaliação para a presença de DNA de FAdV foi realizada de forma individual através de PCR (sumarizado no quadro 4).

Quadro 4- Resultados para a presença de DNA de FAdV e dosagem de aflatoxina de acordo com o escore encontrado em histopatologia nos fígados para cada grupo.

| Número das amostras | Grupo | Escore de lesão | Presença de DNA para FAdV |
|---------------------|-------|-----------------|---------------------------|
| 4, 7, 9, 13, 18 | G1 | + | 2/5 |
| 2, 3, 15, 17, 19 | G2 | ++ | 4/5 |
| 6, 11, 12, 14, 20 | G3 | +++ | 4/5 |
| 1, 5, 8, 10, 16 | G4 | ++++ | 5/5 |

A colheita de órgãos pode permitir uma análise retrospectiva de algumas contaminações, principalmente nas situações em que o alimento não se encontra mais disponível. No entanto, a avaliação dos fígados quanto a presença de aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 por cromatografia em camada delgada com

limite inferior de detecção de 2ppb foi negativa. Como estes fígados foram colhidos na linha de abate e, portanto, os frangos passaram por um período de jejum, é possível que esta micotoxina, se existente, tenha sido metabolizada pela ave para níveis abaixo do limite de detecção ou

a ração ingerida pelas aves realmente não a continha.

Bintvihok *et al.* (2002) administraram 3ppm de aflatoxina em aves de 40 dias de idade por um período de 7 dias, sendo abatidas e pesquisados os níveis de aflatoxina nos músculos e fígado. Estes pesquisadores afirmaram que os níveis de aflatoxina no fígado são dez vezes mais altos que aqueles encontrados nos músculos, e que os níveis de aflatoxina decrescem após a retirada do alimento contaminado. Estes achados reforçam a hipótese que, devido ao grau de agressão sofrido pelo fígado, as aves podem ter apresentado uma redução no apetite, com isso uma diminuição da ingestão de ração e metabolização da aflatoxina.

Segundo os resultados obtidos por Rodrigues (1996), o qual administrou 200ppb de aflatoxina diretamente no ingluvío de frangos de corte, somente é possível detectar a aflatoxina pelo teste de ELISA até duas horas após a ingestão, sendo que a partir deste período os níveis detectados são extremamente baixos ou iguais a zero. Este achado sugere que as aves com altos graus de necrose e vacuolização dos hepatócitos e com menores níveis de toxina detectados, realmente tenham deixado de ingerir o alimento em um período anterior as demais.

Hirano *et al.* (1992), por outro lado, não conseguiram detectar a toxina pela técnica analítica em fígados obtidos em abatedouros, nem em fígados retirados nas granjas de frangos de corte explorados comercialmente. Já Westlake e Dutton (1985) encontraram a presença de aflatoxina B1 em cinco fígados de 27 aves, através da técnica de Cromatografia em Camada Delgada, e verificaram que a hora da amostragem é um fator crítico, já que a toxina é rapidamente metabolizada e excretada pelos tecidos animais.

A avaliação histopatológica dos fígados neste grupo de frangos de corte recebeu um diagnóstico compatível com as alterações causadas por micotoxinas. Esse diagnóstico sugestivo foi dado através de uma avaliação

das alterações encontradas nos fígados, caracterizadas principalmente por necrose hepática, vacuolização dos hepatócitos, hiperplasia dos ductos biliares e infiltração periportal de células inflamatórias. Segundo Tedesco *et al.* (2004), frangos submetidos a ração contaminada com micotoxinas apresentam lesões hepáticas que se caracterizam por infiltração inflamatórias e áreas de necrose, em semelhança ao que foi encontrado neste estudo

Os resultados de PCR para o estudo da detecção do genoma de FAdV nos fígados deste lote de frangos de corte foi de 75% (15/20). Porém, não foi possível estabelecer uma correlação entre a infecção de FAdV e as lesões histopatológicas no fígado, visto que as mesmas lesões foram vistas tanto em fígados negativos quanto positivos para o DNA viral. No entanto, percebeu-se uma detecção do DNA do vírus relativamente crescente de acordo com o aumento das lesões histológicas (quadro 4).

Recentes trabalhos têm revelado lesões histopatológicas mais severas durante a SHH em pintos imunodeprimidos devido à ingestão de micotoxinas (Sandhu *et al.*, 1995).

Shivachandra *et al.* (2003) observaram uma redução significativa no peso dos órgãos linfóides no grupo de pintos infectados com FAdV-4 e ingerindo aflatoxina, quando comparados com os grupos somente infectados com FAdV-4 ou apenas alimentados com ração contendo micotoxina.

A presença destes compostos nas dietas animais muito provavelmente está relacionada aos desempenhos apresentados pela indústria animal. Infelizmente ainda são poucos os artifícios que se pode utilizar quando estes compostos estão comprovadamente presentes nas rações. A melhor alternativa ainda é a prevenção, através de um rígido controle de matéria prima utilizados para a confecção de rações animais, já que a utilização de produtos que atuam como detoxificantes em rações é uma medida paliativa e de alto custo para a indústria.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Pesquisas demonstram que os FAdV estão amplamente disseminados na população avícola. Assim como, foi possível constatar através deste trabalho que a infecção circula em alto grau entre as aves, principalmente na avicultura industrial.

No entanto, a menor presença de DNA de FAdV amplificado nos fígados das matrizes pode ser um indício dos resultados da implementação de rigorosos programas de biossegurança. É amplamente reconhecida a magnitude da importância dessas práticas e do seu cumprimento, principalmente nas unidades de produção avícola industrial, devido às práticas de manejo neste tipo de produção. Com isso, uma incidência diminuída de agentes imunodepressores como a doença de Gumboro e uma relativa insignificância do agente da anemia infecciosa das galinhas, pode refletir no declínio de transmissão vertical do vírus das matrizes às suas progêneses, assim como de transmissão horizontal.

O mesmo raciocínio seria válido para os frangos de corte. A variação na detecção de DNA amplificado sugere que os procedimentos de biossegurança não estão sendo efetivos em prevenir a transmissão horizontal em algumas unidades produtivas. Essa variação pode ser melhor entendida pelas significativas diferenças de práticas de manejo entre as granjas.

Por outro lado, a constatação de DNA de FAdV em todas as galinhas de subsistência avaliadas representam meios veiculadores potenciais importantes na disseminação e manutenção do FAdV. Pelo menos, neste estudo, as vacinais atuais não apresentam risco iminente de contaminação, graças às rigorosas legislações impostas para sua elaboração e fabricação.

Contudo, a infecção latente de FAdV não mostra evidências histopatológicas, comprovando sua baixa sensibilidade. Mesmo as lesões resultantes da infecção de FAdV causando hepatite por corpúsculo de inclusão não são específicas, visto que a

doença mimetiza outras entidades de doenças que são rotineiramente diagnosticadas em laboratórios de doenças de aves.

A imunodepressão nas aves, causada por concomitante contaminação de ração com micotoxinas e infecção com FAdV, tem um efeito sinérgico. Esse achado assume importância prática por causa da associação entre a presença disseminada da infecção de FAdV e a ocorrência comum de micotoxina na ração ser capaz de causar severa imunodepressão, podendo levar a exacerbação de doenças sob condições de campo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDUL-AZIZ, T. A.; AL-ATTAR, M. A. New syndrome in Iraqi chicks. *Vet. Rec.*, v. 129, n. 3, p. 272, 1991.

ABDUL-AZIZ, T. A.; HASAN, S. Y. Hydropericardium syndrome in broiler chickens: its contagious nature and pathology. *Res. Vet. Sc.*, v. 59, n. 2, p. 219-221, 1995.

ABE, T.; NAKAMURA, K.; TOJO, H. *et al.* Histology, immunohistochemistry, and ultrastructure syndrome in adult broiler breeders and broiler chickens. *Avian Dis.*, v. 42, n. 5, p. 606-612, 1998.

ADAIR, B.; M., FITZGERALD, S. D. Adenovirus infections. In.: Saif, Y.M. *Diseases of Poultry*. 12. ed. Ames: Iowa State, 2008. p.251-296.

AGHAKHAN, S. M.; PATTISON, M. Pathogenesis and pathology of infection with two strains of avian adenovirus. *J. Comp. Pathol.*, v. 84, n. 4, p. 495-503, 1974.

AKHTAR, S.; ZAHID, S.; KLAN, M. I. Risk factors associated with hydropericardium syndrome in broiler flocks. *Vet. Rec.*, v. 131, n. 5, p. 481-482, 1992.

- ANJUM, A. D.; SABRI, M. A.; IQBAL, Z. Hydropericarditis syndrome in broiler chickens in Pakistan. *Vet. Rec.*, v. 124, n. 3, p. 247-248, 1989.
- BACK, A.; MOLIN, L.; LEÃO, J. A. ocorrência de hepatite por corpúsculo de inclusão em frangos de corte. Disponível em: <http://www.aveworld.com.br/aveworld/relatorios/post/ocorrencia-de-hepatite-por-corpusculo-de-inclusao-em-frangos-de-corte_2597> Acesso em 10/janeiro, 2011
- BARNES, H. J. Viral enteric infections. In: CALNEK, B. W.; BARNES, H. J.; BERRD, C. W. *et al. Diseases of Poultry*. 10. Ed. Ames: Iowa state University Press, 1997, p. 685-686.
- BINTVIHOK, A.; THIENGNIN, S.; DOI, K. *et al.* Residues of afltoxins in the liver, muscle and eggs of domestic fowls. *J. Vet. Med. Sci.*, v. 64, n. 11, p. 1037-1039, 2002.
- BOOM, R.; SOL, C.; BELD, M. *et al.* Improved silica – guanidiniumthiocyanate DNA isolation procedure based on selective binding of bovine alpha – casein to silica particles. *J. Clin. Microbiol.* v. 37, n. 5, p. 615–619, 1999.
- CARDONA, C. J.; OSWALD, W. B.; SCHAT, K. A. Distribution of chicken anemia virus in the reproductive tissues of specific-pathogen-free chickens. *J. Gen. Virol.* v. 81, n. 9, p. 2067–2075, 2000.
- CHEEMA, A. H.; AHMAD, J.; AFZAL, M. An adenovirus infection of poultry in Pakistan. *Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz.*, v. 8, n. 5, p.797-801, 1989.
- COOK, J. K. A. Incidence of chick embryo lethal orphan virus antibody in the fowl (*Gallus domesticus*) in Britain. *Res. Vet. Sci.*, v. 11, n. 5, p. 343-348, 1970.
- COOK, J. K. A. Incidence of chick embryo lethal orphan virus antibody in the fowl (*Gallus domesticus*) in Britain. *Res. Vet. Sci.*, v 11, n. 5, p. 343-348, 1970.
- COOK, J. K. A. Spread of an avian adenovirus (CELO virus) to uninoculated fowls. *Res. Vet. Sci.*, v. 82, n. 4, p. 119-128, 1972.
- COOK, J. K. A. Pathogenicity of avian adenoviruses for day-old chicks. *J. Comp. Pathol.*, v. 84, n. 4, p. 505-515, 1974.
- COWEN, B. S.; LU. H.; WEINSTOCK, D; CASTRO, A. E. Pathogenicity studies of fowl adenovirus isolated in several regions of the world. In: *Proceedings of the international symposium on adenovirus and reovirus infections in poultry*. n.1, 1996. Rauschholzhausen. Proc...Germany, 1996. p. 75-78.
- DHILLON, A. S.; KIBENG, F. S. B. Adenovirus infection associated with respiratory disease in commercial chickens. *Avian Dis.*, v. 31, n. 7, p. 654-657, 1987.
- ERNY, K. M.; BARR, D. A.; FAHEY, K. J. Molecular characterization of highly fowl adenoviruses associated with outbreaks of inclusion body hepatitis. *Avian dis.*, v. 20, n. 4, p. 597-606, 1991.
- FADLY, A. M.; RIEGLE, B. J.; NAZERIAN, K.; *et al.* Some observations on an adenovirus isolated from specific pathogen free chickens. *Poultry Sci.*, v. 59, n. 1, p. 21-27, 1980.
- FITZGERALD, S. D.; REED, W. M.; LAGHEINRICH, K. A. *et al.* A retrospective immunohistochemical study of tipe II avian adenovirus infection in turkey, pheasant, and chicken tissues. *Avian Dis.*, v. 38, n. 1, p. 78-85, 1994.
- GALLINA, A. M.; WINTERFIELD, R. W.; FADLY, A. M. Adenovirus infection and disease. II. Histopathology of natural e experimental disease. *Avian Dis.*, v. 17, n. 2, p. 343-353, 1973.
- GORYO, M. UEDA, Y.; UMEMURA, T. *et al.* Inclusion Body hepatitis due to adenovirus in pigeons. *Avian Pathol.*, v. 17, n. 2, p. 391-401, 1988.

- GOWDA, R. N. S.; SATYANARAYANA, M. L. Hydropericardium syndrome in poultry. *Ind. J. Vet. Pathol.*, v. 18, n. 1, p. 159-161, 1994.
- GRGIC, H.; PHILIPPE, C.; OJKIC, D. et al. Study of vertical transmission of fowl adenoviruses. *Can. J. Vet. Res.*, v. 70, n. 3, p. 230-233, 2006.
- GUY, J. S.; BARNES, H. J.; SMITH, L. et al. Partial characterization of an adenovirus-like virus isolated from broiler chickens with transmissible viral proventriculitis. *Avian Dis.*, v. 49, n. 5, p. 344-351, 2005.
- HESS, M. Detection and differentiation of avian adenoviruses: a review. *Avian Pathol.*, v. 29, n. 3, p. 195-206, 2000.
- HESS, M.; RAUE, R.; PRUSAS, C. Epidemiological studies on fowl adenoviruses isolated from cases of infectious hydropericardium. *Avian Pathol.*, v. 28, n. 5, p. 433-439, 1999.
- HIRANO, K.; ADACHI, Y.; BINTVIHOK, A. et al. An improved method for extraction and cleanup of Aflatoxin B1 from liver. *J. Vet. Med. Sci.*, v. 54, n. 5, p. 567-569, 1992.
- HOERR, F. J. Mycotoxins. In: CALNEK, B. W. et al. (eds.) *Diseases of Poultry*, Iowa: Iowa State University Press, 1999, p. 884-915.
- VIRUS taxonomy. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Disponível em: www.ictvonline.org. Acessado em: 18/12/2010
- IVANOV, I. D. *Histopatologia and cytologia of poultry diseases*. 5. ed. Bulgaria: Imprimerie, 2009, 96 p.
- JIANG, P.; OJKIC, D.; TUBOLY, T. et al. Application of the polymerase chain reaction to detect fowl adenoviruses. *Can. J. Vet. Res.*, v. 63, n. 2, p. 124-128, 1999.
- JORGENSEN, P. H.; OTTE, L.; NIELSEN, O. L. et al. Influence of subclinical virus infections and other factors on broiler performance. *Brit. Poul. Sci.*, v. 36, n. 5, p. 455-463, 1995.
- KAWAMURA, H. e HORIUCHI, T. Pathological changes in chickens inoculated with CELO virus. *Nat. Inst. Anim. Healthy Q.*, v. 4, n. 1, p. 31-39, 1964.
- KAWAMURA, H. e TSUBAHAET, H. Serological relationship between CELO and GAL viruses. *Nat. Inst. Anim. Healthy Q.*, v. 3, n. 1, p. 77-82, 1963.
- LATIMER, K. S.; NIAGRO, F. K.; WILLIAMS, A. R. et al. Diagnosis of avian adenovirus infections using DNA in situ hybridization. *Avian Dis.*, v. 41, n. 4, p. 773-782, 1997.
- MAZAHERI, A.; PRUSAS, C.; VOß, M. et al. Some strains of serotype 4 fowl adenoviruses cause inclusion body hepatitis and hydropericardium syndrome in chickens. *Avian Pathol.*, v. 27, n. 3, p. 269-276, 1998.
- MCFERRAN, J. B.; ADAIR, B. M. Avian Adenovirus – a review. *Avian Pathol.*, v. 6, n. 3 p. 189-217, 1977.
- MCFERRAN, J. B.; SMYTH, J. A. Avian Adenovirus. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, v.19, n.2 p.589-601, 2000.
- MEULEMANS, G.; BOSCHMANS, M.; BERG, T. P. et al. Polymerase chain reaction combined with restriction enzyme analysis for detection and differentiation of fowl adenovirus. *Avian Pathol.*, v. 30, n. 6, p. 655-660, 2001.
- NAKAMURA, K.; TANAKA, H.; MASE, M. et al. Pancreatic necrosis and ventricular erosion in adenovirus-associated hydropericardium syndrome of broilers. *Vet Pathol.*, v. 39, n. 5 p. 403-406, 2002.

- OJKÍC, D.; KRELL, P. J.; TUBOLY, T. et al. Characterization of fowl adenoviruses isolated in Ontario and Quebec, Canada. *Can. J. Vet. Res.*, v. 72, n. 3, p. 236–241, 2008.
- ONO, M.; OKUDA, Y.; YAZAWA, S. et al. Adenoviral Gizzard Erosion in Commercial Broiler Chickens. *Vet Pathol.*, v. 40, n. 3, p. 294-303, 2003.
- PHILIPPE, C.; GRGIC, H.; OJKIÆ, D. et al. Serologic monitoring of a broiler breeder flock previously affected by inclusion body hepatitis and testing of the progeny for vertical transmission of fowl adenoviruses. *Can. J. Vet. Res.* v. 71, n. 2, p. 98–102, 2007.
- PIER, A. C. Mycotoxins and animal health. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.*, v. 42, n. 1, p. 185-243, 1981.
- RAUE, R.; HESS, M. Hexon based PCRs combined with restriction enzyme analysis for rapid detection and differentiation of fowl adenoviruses and egg drop syndrome virus. *J. Virol. Methods*, v. 73, n. 2, p. 211-217, 1998.
- REBEL, J. M. J.; BALK, F. R. M.; POST, J. et al. Malabsorption syndrome in broilers. *World's Poult. Sci. J.*, v. 62, n. 1, p. 17-30, 2006
- REECE, R. L.; BARR, D. A.; GRIX, D. C. An investigation of vertical transmission of a fowl adenovirus serotype 8. *Aust. Vet. J.*, v. 62, n. 4, p. 136-137, 1985.
- RODRIGUES, O. *Detecção de aflatoxina B1 e ocratoxina A no organismo de frangos de corte, através do emprego do ensaio imunoenzimático utilizando anticorpos monoclonais (ELISA)*. 1996. 84f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- ROMANOVA, N.; CORREDOR, J. C.; NAGY, E. Detection and quantitation of fowl adenovirus genome by a real-time PCR assay. *J. Virol. Methods*, v. 159, n. 1, p. 58–63, 2009.
- ROY, P.; MURALIMANO HAR, B.; KOTEESWARAN, A. et al. Experimental studies on hydropericardium syndrome in two different synthetic lines of broiler chickens. *Vet. Arhiv.*, v. 74, n. 2, p. 157-164, 2004.
- SANDHU, B. S.; SINGH, H.; SINGH, B. Pathological studies in broiler chicks fed aflatoxin or ochratoxin and inoculated with inclusion body hepatitis virus singly and in concurrence. *Vet. Res. Comm.*, v. 19, n. 1, p. 27-37, 1995.
- SHANE, S. M. Hydropericardium - hepatitis syndrome the current word situation. *Zoot. Intern.*, v. 15, n. 1, p. 20-27, 1996.
- SHIVACHANDRA, S. B.; SAH, R. L.; SINGH, S. D. et al. Immunossuppression in broiler chicks fed aflatoxin and inoculated with fowl adenovirus serotype-4 (FAV-4) associated with hydropericardium syndrome. *Vet. Res. Comm.*, v. 27, n. 1, p. 39-51, 2003.
- SINGH, A.; OBEROI, M. S.; GREWAL, G. S. et al. The use of PCR combined with restriction enzyme analysis to characterize fowl adenovirus field isolates from northern India. *Vet. Res. Comm.*, v. 26, n. 7, p. 577-585, 2002.
- SINGH, A.; OBEROI, M. S.; JAND, S. K. et al. Epidemiology of inclusion body hepatitis in poultry in northern India from 1990 to 1994. *Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz.*, v. 15, n. 3, p. 1053-1060, 1996.
- TORO, H.; GONZALEZ, C.; CERDA, L. et al. Chicken anemia virus and fowl adenovirus: association to induce the inclusion body hepatitis/ hydropericardium syndrome. *Avian Dis.*, v. 44, n. 1, p. 51-58, 2000.

TORO, H.; GONZALEZ, O.; ESCOBAR, C. et al. Vertical induction of the inclusion body hepatitis/hydropericardium syndrome with fowl adenovirus and chicken anemia virus. *Avian Dis.*, v. 45, n. 1, p. 215-222, 2001.

TORO, H.; PRUSAS, C.; RAUE, R. et al. Characterization of fowl adenoviruses from outbreaks of inclusion body hepatitis/hydropericardium syndrome in Chile. *Avian Dis.*, v. 43, n. 2, p. 262-270, 1999.

VAN ECK, J.H.; DAVELAAR, HEUVELPLESMAN, T. A.; VAN KOL, N. et al. Dropped egg production, soft shelled and shell-less eggs associated with appearance of precipitins to adenovirus in flocks of laying fowls. *Avian Pathol.*, v. 5, n. 4, p. 261-272, 1976.

VOSS, M.; VIELITZ, E.; HESS, M. et al. Aetiological aspects of hepatitis and HPS caused by pathogenic adenoviruses in different countries. In: *Proceedings of the international symposium on adenovirus and reovirus infections in poultry*. n. 1, 1996. Rauschholzhausen, Germany, Proc... 1996. p.. 75-78.

XIE, Z.; FADL, A. A.; GIRSHICK, T. et al. Detection of avian adenovirus by polymerase chain reaction. *Avian Dis.*, v. 43, n. 1, p. 98-105, 1999.

WAGES, D. P.; OPENGARD, K. Necrotic enteritis. In.: Saif, Y.M. *Diseases of Poultry*. 11. ed. Ames: Iowa. Iowa State, 2003. p.781-783.

WESTLAKE, K.; DUTTON, M. F. The incidence of mycotoxins in litter, feed, and livers of chickens in Natal. *S.Afr.J.Anim.Sci.*,v. 15, n.1, p.175-177, 1985.

WILSON, F. D.; WILLS, R. W.; SENTIESCUE, C. G. et al. High incidence of glomerulonephritis associated with inclusion body hepatitis in broiler chickens: routine histopathology and histomorphometric studies. *Avian Dis.*, v. 54, n. 3, p. 975-980, 2010.