

Francilane Rodrigues Gomes

T636.089 69

G6330

2004



**VÍRUS DA ANEMIA INFECCIOSA DAS GALINHAS: PERFIL SOROLÓGICO
EM MATRIZES PESADAS E PRESENÇA DO VÍRUS EM SUA PROGÊNIE.**

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

Área: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Prof^a. Zélia Inês Portela Lobato

Belo Horizonte
UFMG - Escola de Veterinária
2004

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA

10/03/08

1077808-10

U38056

G633v Gomes, Francilane Rodrigues, 1973-

Vírus da anemia infecciosa das galinhas: perfil sorológico em matrizes pesadas e presença do vírus em sua progênie / Francilane Rodrigues Gomes. - 2004.

47 p. : il.

Orientadora: Zélia Inês Portela Lobato
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária

Inclui bibliografia

1. Galinha – Doenças – Teses. 2. Anemia – Teses. 3. Teste imunoenzimático – Teses. I. Lobato, Zélia Inês Portela. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 636.508 96

Tese defendida e aprovada em 8 de Setembro de 2004
pela comissão examinadora constituída por



Prof. Zélia Inês Portela Lobato
Presidente



Prof. José Sérgio de Resende



Prof. Nelson Carneiro Baião



Dr. Roberto Becht Flatschart

DEDICO

A Deus, pela oportunidade e força em todos os momentos. A toda a minha família que são o suporte da minha vida, e a todos que estiveram ao meu lado, pela paciência e carinho.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida

Aos meus pais pelo amor, carinho, incentivo, que junto comigo idealizaram mais esta conquista e me deram todo o apoio necessário

Aos meus irmãos que sempre me incentivaram a enfrentar esta etapa tão importante da minha vida

À minha sobrinha Paula Gabriella pelo grande carinho e por sempre estar ao meu lado mesmo nas horas mais difíceis

Ao Leandro pelo amor e compreensão, principalmente pelas horas de ausência dedicadas aos estudos e por acreditar no meu potencial

Aos grandes amigos Alberto Henrique Rocha Filho e Tico, por sempre me apoiarem em todos os projetos que levem ao meu crescimento profissional

À Alimenta Avícola S.A. por ter me incentivado e liberado para fazer o mestrado

À Prof Zélia P. Lobato, por ter aceitado me orientar no momento mais difícil do trabalho e me ajudado tanto com sua grande sabedoria

Ao Prof. José Sérgio de Resende pela orientação, ensinamentos, paciência e pela grande amizade

Ao Dr. Roberto B. Flatschart pela ajuda em momentos decisivos do experimento e do mestrado aceitando a co-orientação do meu trabalho

À Dra. Áurea Folgueras-Flatschart pelas sugestões e torcida

Ao Prof. Nelson R. S. Martins por ter me aceitado como aluna de mestrado desta instituição

Aos funcionários do laboratório do setor de doenças das aves

À Daniela, pelo apoio, amizade e grande ajuda nos experimentos e nos momentos mais difíceis na realização deste trabalho

À Josiane pela amizade de tantos anos

À Intervet pelo apoio na realização prática do trabalho

Ao Laboratório Simbios Biotecnologia pelos ensinamentos e grande ajuda na realização dos experimentos

Aos professores do curso de pós-graduação pelos ensinamentos

A todos os meus amigos e colegas que de alguma forma contribuíram para que esse momento pudesse acontecer

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	13
RESUMO	15
ABSTRACT	15
1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVOS	19
2.1. Objetivo Geral	19
2.2. Objetivos Específicos	19
3. REVISÃO DE LITERATURA	19
3.1. Anemia Infecciosa das galinhas	19
3.1.1 Etiologia	19
3.1.2. A doença	20
3.1.3. Patogenicidade	21
3.1.4. Transmissão	21
3.1.5. Imunossupressão induzida pelo VAIG	22
3.1.6. Resistência de idade a doença	23
3.1.7. Interações do VAIG com outros agentes	24
3.1.8. Impacto econômico	24
3.1.9. Diagnóstico	25
3.1.10. Prevenção e Controle	26
3.2. ELISA – Enzyme Linked Immunosorbent Assay	27
3.3. PCR – Reação de Polimerase em Cadeia	27
4. MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1. Local de realização dos experimentos	28
4.2. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	28
4.2.1. Soros testados	28
4.2.2. Execução do ELISA	29
4.2.3. Interpretação de resultados do ELISA	30
4.3. Reação de Polimerase em Cadeia	30
4.3.1. Obtenção dos ovos e embriões para detecção do VAIG por PCR	30
4.3.2. Metodologia	31
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1. ELISA	31
5.2. Reação de polimerase em cadeia-PCR	40
6. CONCLUSÕES	43
7. REFERÊNCIAS	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Discriminação dos lotes de recria e respectivas idades estudadas.....	29
Tabela 2.	Discriminação dos lotes e respectivas idades de produção com número de soros testados	29

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Ilustração esquemática do princípio do ELISA competitivo utilizado para detecção de anticorpos contra o VAIG em soro de galinhas. (Idexx, EUA).....	29
Figura 2.	Taxas de animais soropositivos para o Vírus da Anemia Infecciosa das Galinhas em lotes de matrizes pesadas não vacinadas de um dia a 62 semanas de idade em diferentes fases de produção.	33
Figura 3.	Taxas de animais soropositivos para o Vírus da Anemia Infecciosa das Galinhas em lotes de matrizes pesadas em diferentes fases de recria, com percentual de soros com razão S/N considerada protetora no total de anticorpos.....	35
Figura 4.	Taxas de animais soropositivos em ELISA para o Vírus da Anemia Infecciosa das Galinhas de lotes de matrizes pesadas em diferentes fases de postura	37
Figura 5.	Taxa de animais soropositivos em ELISA para o vírus da anemia infecciosa das galinhas em lotes de matrizes pesadas em diferentes fases de postura, com percentual de anticorpos considerados protetores dentre estes positivos	37
Figura 6.	Taxa de animais soropositivos em ELISA para o vírus da anemia infecciosa das galinhas de lotes de matrizes pesadas em diferentes idades, com percentual de anticorpos considerados protetivos dentre esses positivos	38
Figura 7.	Valores médios, máximo, mínimo e desvio padrão da razão S/N no teste ELISA para lotes de matrizes pesadas em diferentes fases do ciclo produtivo.....	40
Figura 8.	Eletroforese dos produtos de PCR de embriões em gel de poliacrilamida 10% corado com nitrato de prata. Canaletas 1 a 5: lote J ; canaletas 6 a 10: lote I; canaletas 11 a 13 lote H. A posição da banda de 228 bp do controle positivo é demonstrada pela seta. PM: peso molecular ("50 bp ladder" - Pharmacia); C+: controle positivo; C-: controle negativo.....	41
Figura 9.	Eletroforese dos produtos de PCR em gel de poliacrilamida. Canaletas 14 a 15: lote H; canaletas 16 a 20: lote G; canaletas 21 a 25: lote F. A posição da banda de 228 bp do controle positivo é demonstrada pela seta. PM: peso molecular ("50 bp ladder" - Pharmacia); C+: controle positivo; C-: controle negativo	41

LISTA DE ABREVIATURAS

AIG	Anemia Infecciosa das Galinhas
CAA	<i>Chicken Anemia Agent</i>
CAV	<i>Chicken Anemia Virus</i>
DN	Doença de Newcastle
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
HVT	Herpesvirus de peru (<i>Turkey Herpesvirus</i>)
IM	Intramuscular
OD	Densidade Óptica
OEG	Ovos embrionados de galinha
PCR	Reação de polimerase em cadeia
PI	Pós inoculação
S/N	Soroneutralização
SPF	Specific Pathogen Free (Livre de patógenos especificados)
VAIG	Vírus da Anemia Infecciosa das Galinhas
VDN	Vírus da Doença de Newcastle
TA	Temperatura ambiente

RESUMO

Uma vez que o conhecimento do perfil sorológico do Vírus da anemia Infecciosa das Galinhas e da presença do vírus na progênie em lotes de matrizes pesadas são essenciais para o delineamento de estratégias de controle da doença, foi realizado um estudo de distribuição de anticorpos por idade em uma granja situada no Estado de Minas Gerais. Soro de aves matrizes pesadas em diferentes fases do ciclo de produção foram coletadas e testadas por ELISA competitivo. Logo após o término da coleta dos soros, as aves foram separadas em compartimentos situados no final de cada galpão e os ovos postos por elas foram coletados, marcados e incubados. Após 20 dias de incubação, esses ovos foram retirados e levados para o laboratório, onde macerados de conteúdo abdominal dos embriões foram analisados em forma de *pools* de seis ovos por lote através de Nested-PCR. Foram avaliados os principais índices zootécnicos da progênie destes lotes de matrizes em clientes criadores de pintos de um dia. Em lotes de matrizes pesadas, com 97,22 a 100% de animais soropositivos e soroprotectores para o VAIG através do ELISA, não houve transmissão de vírus para a progênie testada. A soroconversão, na granja testada, ocorreu pela infecção natural das aves com o vírus, antes do início de postura em mais de 90% dos animais testados, ocorrendo provavelmente entre 12 a 15 semanas, demonstrado pelo início da detecção de animais soropositivos às 17 semanas de idade.

Palavras-chave: matrizes pesadas, Anemia Infecciosa das Galinhas, Vírus da Anemia Infecciosa das Galinhas, anticorpos, ELISA, "Nested-PCR".

ABSTRACT

The epidemiological study of the chicken infectious anemia virus (CIAV) must include the evaluation of breeders and their progeny. For broiler breeders, in particular, it is essential that this knowledge will enable the adoption of flock management strategies to result in economical benefit. This study describes the evaluation of a broiler breeder enterprise in the State of Minas Gerais, Brazil, in view of the importance of CIAV for the ideal health and productivity. Serum and embryonic samples were obtained for ELISA and PCR analyses. The same hens sampled for serum were separated for egg incubation and embryonic sampling. The abdominal organs of embryos at 20 days of incubation were collected for nested-PCR in pools of 6 embryos per flock. Production data of the progeny broilers of these breeders were obtained for analysis. Relating to antibody detection and its association to CIAV genome in embryos, results have shown that flock reactivity levels above 97,22% reflected in zero transmission to the embryo, as determined by PCR. Antibody occurrence is due to natural challenge before sexual maturity in more than 90% of tested flocks. Challenge is believed to have occurred between weeks 12 to 15 of age, as antibodies were detected from 17 weeks of age onwards. Evaluated flocks have apparently been under natural challenge that enabled serum conversion as detected from week 17 of age. Such condition has ensured protection to the breeders and their progeny, as such breeder will not transmit CIAV vertically and passive antibodies will be protective to early horizontal challenge. Production data are corroborative of sera and PCR results.

Keywords: Broiler breeders, Chicken infectious anemia virus, CIAV, antibody, ELISA, nested-PCR.

1. INTRODUÇÃO

A importância econômica e social da avicultura brasileira coloca o setor em evidência nos âmbitos nacional e internacional. Atualmente, o Brasil é o segundo maior exportador mundial de carne de frango e no mercado interno o consumo é de 33,9 Kg de carne de frango e de 130 ovos por habitante/ano. Em 2004 o consumo total de carne de frango foi de 6.069 toneladas, com uma produção de 8.494 toneladas (UBA, 2004).

Em 1979, Yuasa et al. (1979a) descreveram o isolamento no Japão de um agente filtrável e transmissível em pintos livres de patógenos especificados (SPF) de um dia de idade, inoculados com material de campo, o qual denominaram "Chicken Anemia Agent" - CAA (agente da anemia das galinhas). O CAA causou em aves jovens uma doença caracterizada por aumento da mortalidade, anemia associada com aplasia de medula óssea, hemorragias subcutâneas e intramusculares e generalizada atrofia de órgãos linfóides. A marcada lesão de tecidos linfóides sugeria a importância deste agente como causa de uma doença imunossupressora em aves.

Análises morfológicas subseqüentes em microscopia eletrônica caracterizaram-no como um pequeno vírus de DNA circular não envelopado e a denominação de agente foi então, substituída por Vírus da Anemia Infecciosa das Galinhas (VAIG) (Brentano, 2000).

Na Suécia, esta doença já era conhecida desde 1972 e os criadores a chamaram de "doença da asa azul" (Engstrom e Luthman, 1984). Nos anos 80, surtos múltiplos e intensos de dermatite gangrenosa e anemia aplástica afetaram a indústria de frango de corte na Alemanha. Observações epidemiológicas indicavam uma associação próxima desta nova doença com os lotes de reprodutoras, situação similar à ocorrida com a encefalomielite aviária em 1960/61.

O agente da anemia foi, então, isolado na Alemanha (Bullow et al., 1996, citado por

Brentano et al. 1991), na Suécia (Engstrom e Luthman., 1988), nos Estados Unidos (Rosenberger e Cloud, 1989a), Reino Unido (McNulty et al., 1988), e em 1990 na Austrália e no Brasil (Brentano et al., 1991). A partir de então, inúmeros relatos do diagnóstico do VAIG foram feitos em diversos países e atualmente, é reconhecido como um vírus imunossupressor distribuído mundialmente e economicamente importante em países com avicultura intensiva.

O trabalho realizado por Yuasa et al. (1983b), permitiu-lhe estabelecer a dificuldade de se cultivar esse agente na maioria dos cultivos celulares, a não ser em algumas linhas de células linfóides MDCC-MSB1 derivadas de tumor de Marek, que crescem em suspensão e não formam monocamadas aderentes. A disponibilidade de células MSB-1 infectadas com VAIG tornou possível a purificação de vírus dos sobrenadantes de culturas de células infectadas para uso como antígeno, assim como a detecção de anticorpos anti-VAIG no soro de aves ou na gema do ovo por testes de imunofluorescência indireta (Bullow e Schat, 1997). Quando cultivado nestas células, o VAIG causa um efeito citopático caracterizado pelo aumento do tamanho e refratibilidade celular, formação de grumos e morte celular. As células MDCC-MSB1 infectadas pelo VAIG produzem baixos títulos, em torno de 10^5 a 10^6 TCID₅₀/0,1 ml. (Yuasa, 1983a).

As galinhas são o único hospedeiro natural conhecido do vírus (Pope, 1991). Anticorpos contra VAIG não foram encontrados em um pequeno levantamento feito no soro de patos e de perus no Reino Unido (McNulty et al., 1988). Perus com um dia de idade inoculados via intramuscular com o VAIG não mostraram sinais clínicos de anemia e nem desenvolveram anticorpos para o vírus. Não há evidências de que o vírus infecte e cause doença na espécie humana, não constituindo o VAIG, portanto, riscos à saúde pública e alimentar.

Pesquisas sorológicas tem demonstrado alta prevalência de anticorpos em galinhas mais velhas, tanto em matrizes leves quanto

em matrizes pesadas. Além disso, a progênie de matrizes imunes freqüentemente desenvolve anticorpos para VAIG ativamente adquiridos, quando examinados no abate (Yuasa et al., 1980; McNulty et al., 1988; Rosenberger e Cloud, 1989a; Lucio et al., 1990). Segundo McNulty et al. (1988), estes anticorpos foram detectados no soro coletado no momento do abate de 7 entre 13 lotes de frangos no Reino Unido e em 15 entre 23 lotes no Canadá. Estes anticorpos são predominantemente devido a infecções adquiridas de forma horizontal, originadas de vírus remanescentes de lotes anteriormente criados nesses mesmos galpões, através de contato com aves que foram infectadas verticalmente e estavam excretando o vírus, ou através da introdução de vírus por fatores externos.

Pesquisas da soroprevalência do vírus por diferentes métodos sorológicos, foram demonstrados em diversos trabalhos. McNulty et al. (1989a), demonstraram que 100% dos lotes testados em três estados de alta importância na produção avícola nos EUA tinham animais positivos na sorologia para uma amostra comprovadamente pertencente ao mesmo sorotipo dos isolados Cux-1 e Gifu-1 de VAIG, variando o percentual de positividade em cada lote testado de 40% a 100%.

Na década de 80, anticorpos contra VAIG foram detectados em muitos lotes de aves SPF (Yuasa et al., 1980; McNulty et al., 1989b). Em 1994, alguns autores alemães relataram a presença de anticorpos em aves SPF, testadas por imunofluorescência, independentemente do lote, idade e linha genética. O mais estranho deste caso, é que as aves eram soronegativas para os outros vírus analisados (leucose aviária, doença de Marek, Reovírus, Adenovírus e doença de Gumboro), *Mycoplasma gallisepticum*, *M. synoviae* e *Salmonella pullorum*. A transmissão vertical do VAIG em lotes destinados à produção de imunobiológicos deve ter garantido por muitos anos a disseminação do mesmo em vacinas vivas (Yuasa et al., 1983b). A realidade atual é diferente e estão

disponíveis vários métodos para o controle de qualidade destes lotes SPF.

Até o ano de 1989, a AIG havia sido identificada em diversos países, alertando para a necessidade de investigação de sua presença no Brasil. Com a colaboração da agroindústria, Brentano (2000), testou aves comerciais em linhas de corte no sul do Brasil e em São Paulo, com quadros clínicos compatíveis com anemia, tais como: lotes de frangos de três a seis semanas de idade com histórico de grande desuniformidade, palidez de carcaças, medula óssea rósea a amarelada (aplasia de medula) e variados graus de atrofia de timo. Em alguns casos havia perdas econômicas significativas também devido a condenações de carcaças por hemorragias musculares associadas ou não à dermatite conhecida como "síndrome anemia e dermatite", característica de surtos de VAIG descritos em alguns países. Foi desenvolvida então, pela EMBRAPA SUÍNOS E AVES -SC, uma metodologia para o isolamento e identificação sorológica por ELISA do VAIG com anticorpo monoclonal específico, o que resultou nos primeiros relatos da presença do vírus da anemia no Brasil.

Foi feito um levantamento sorológico em 1999, com amostragem significativa das matrizes de corte do país, englobando Estados com produção comercial intensiva (RS, SC, PR, SP, MG, PE, PB e CE), mostrando que 92% das matrizes pesadas testadas apresentavam anticorpos contra o VAIG e portanto, indicando que o vírus é altamente prevalente e amplamente distribuído no Brasil (Brentano et al., 2000). Segundo este trabalho, lotes de 18 a 24 semanas, apresentam maior desuniformidade no número de aves positivas e negativas e variações maiores nos níveis de anticorpos. Estes dados sugerem uma progressiva disseminação do vírus, apontando casos em ocorrência em lotes de matrizes ainda não adequadamente imunes contra o VAIG, no período anterior à fase de postura (Brentano et al., 2000).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo detectar aspectos da transmissão do vírus da anemia infecciosa das galinhas durante a fase de postura em matrizes pesadas através da técnica PCR e estudar o perfil sorológico destas matrizes através da técnica de ELISA.

2.2. Objetivos específicos

Os objetivos específicos deste estudo foram:

1. Avaliar o perfil sorológico do VAIG em matrizes pesadas em diferentes fases de recria e produção.
2. Verificar a transmissão vertical do VAIG na progênie de matrizes pesadas em diferentes faixas etárias.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Anemia Infecciosa das Galinhas

3.1.1. Etiologia

O VAIG tem apenas 25 nanômetros de diâmetro, possui morfologia icosaédrica, sem envelope e é purificado em gradiente de cloreto de cério a uma densidade de 1,35 a 1,36 g/cm³ (Brentano, 1999). Seu genoma consiste de DNA circular de fita simples de cerca de 2,3 kilobases (2300 nucleotídeos), que se multiplica em células infectadas, via uma forma replicativa intermediária de DNA de fita dupla (Gelderblom, et al. citado por Brentano, 1999). Esta estrutura de genoma, morfologia e tamanho da partícula do VAIG são comuns aos circovírus, como o circovírus suíno e o vírus de bico e penas de psitacídeos, incluindo o VAIG provisoriamente junto a estes vírus na família Circoviridae (Brentano, 2000). Em literaturas mais recentes foi agrupado como

um vírus da família Circoviridae, gênero *Gyrovirus*, sendo até o momento o único agente neste grupo (Pringle, 1999, citado por Todd, 2000, p.374).

O DNA replicativo intermediário do VAIG apresenta três ORFs ("open reading frames") sobrepostas, as quais codificam três proteínas virais: VP1 (51,6 kDa), VP2 (24kDa) e VP3 (13,6 kDa). A análise da composição de proteínas presentes nas partículas virais purificadas por eletroforese e imunoprecipitação mostra apenas a proteína maior VP1, sugerindo ser esta a única proteína estrutural que compõe o capsídeo do vírus. As proteínas VP2 e VP3 são detectadas apenas em células infectadas, mas não na partícula viral purificada, devendo, portanto, ser sintetizadas durante o curso de replicação do vírus na célula, e não incorporadas nas partículas virais maduras. (Todd et al., 1992; Brentano, 2000).

A proteína VP1 é responsável pela adsorção e penetração viral, sendo importante na indução de anticorpos neutralizantes protetores. Quanto à proteína VP2, presume-se que a sua presença seja condição necessária ao desenvolvimento de anticorpos neutralizantes ao associar-se a VP1 no processo de maturação do vírus na célula infectada e, portanto, determine a sua conformação ou participe na apresentação de epitopos de VP1 para o sistema imune. Já a proteína VP3 seria responsável pela indução de apoptose celular (Notetorn et al. citado por Brentano et al., 2000).

O VAIG é altamente resistente à inativação química e ao calor, o que lhe confere a capacidade de persistir no ambiente. O vírus resiste ao éter, clorofórmio, acetona a 90% por 24 horas, fenol a 5%, desinfetantes à base de ortodichlorobenzeno, detergentes quaternários de amônio 5% e em pH3 por três horas (McNulty, 1991; Bullock e Schat, 1997). Resiste também, à fumigação por 24 horas com formaldeído ou óxido de etileno e ao calor de 56°C ou 70°C por 1 hora. O vírus é parcialmente resistente a 80°C por 30 minutos, mas completamente inativado por calor de 100°C por 15 minutos (Goryo et al., 1985). O VAIG é inativado com fenol a

50% por cinco minutos, por iodo e hipoclorito de sódio em concentrações de pelo menos 10% por duas horas a 37°C, mas não nas concentrações usuais de 2%. Para segurança do laboratório, a autoclavagem de todo material contaminado (órgãos, vidrarias, etc.) por 35 minutos, ou altas concentrações de hipoclorito de sódio em estufa, podem ser utilizadas para inativar o VAIG. Contudo, a eliminação do vírus em granjas é considerada difícil e também cara, devido às altas concentrações necessárias de agentes químicos para uma efetiva inativação (Brentano, 2000).

O VAIG pode ser propagado em cultura de células, embriões de galinhas e em pintos de 1 dia de idade. A propagação do VAIG em embriões de galinha, após inoculação via saco da gema aos cinco dias de incubação, resultou em altos títulos virais de todas as partes do embrião coletados aos 14 dias (Bulow et al., 1997). Pintos de embriões inoculados com VAIG via saco da gema eclodiram normalmente, mas apresentaram quadro de anemia sete dias mais tarde e morreram entre 10 e 15 dias de idade (Yuasa et al., 1983c).

Pintos inoculados com um dia de idade desenvolveram anemia e lesões nos tecidos linfóides e medula óssea. A mortalidade ocorre entre 12 e 28 dias pós inoculação e normalmente é baixa, raramente excedendo a 30%. A habilidade de produzir anemia experimentalmente está diretamente relacionada à dose de vírus inoculada. (Yuasa et al., 1979b; Rosenberger e Cloud, 1989b).

3.1.2. A Doença

A anemia infecciosa das galinhas é uma doença de aves jovens, caracterizada por marcada anemia, aplasia de medula óssea, mortalidade variável, atrofia generalizada de órgãos linfóides, retardo no crescimento e imunossupressão. Surto da doença são observados principalmente em lotes de duas a cinco semanas de idade, causando significativo impacto na produção (Brentano, 2000). Pintos com um dia de idade, sem anticorpos maternos, inoculados por via intramuscular com VAIG desenvolveram

uma síndrome entre 10 e 14 dias de idade, caracterizada por anemia aplástica, redução dos valores de hematócrito para menos de 27% (o normal seria 35-36%), atrofia linfóide generalizada envolvendo todos os tecidos hematopoiéticos e linfóides, hemorragias subcutânea e intramuscular e aumento da mortalidade (Yuasa et al., 1979a, 1986; McNulty et al., 1989b; Engstron e Luthman, 1988; Pope, 1991).

O período de incubação, compreendido entre a infecção inicial e a manifestação de sintomas e lesões, pode variar de 10 a 21 dias, dependendo da carga viral infectante, condições de manejo ou outras doenças concomitantes e patogenia da amostra viral circulante. Uma vez que aves infectadas com mais de duas a três semanas não mais desenvolvem a doença clínica, esse período de incubação determina que surtos em campo sejam mais comumente observados em lotes de aves de duas a cinco semanas de idade (Brentano, 2000).

Apesar de os sinais clínicos não serem claros ou específicos, pois não são únicos ao VAIG, normalmente são observados depressão, retardo no crescimento e grande desuniformidade do lote, especialmente em frangos. O mais sugestivo é a presença de anemia evidenciada por graus variados de palidez da musculatura, cristas e barbelas. Podem ser observadas hemorragias musculares nas asas, no tórax, abdômen, coxas e pés e dermatites secundárias (Engstron e Luthman, 1984).

Os primeiros sinais da doença usualmente ocorrem no final da segunda semana de vida. O pico de mortalidade ocorre entre cinco a seis dias do início dos sinais clínicos. Em alguns lotes um segundo e menor pico de mortalidade ocorre duas semanas depois do primeiro, normalmente entre 30 a 33 dias de idade (Engstron e Luthman, 1984). Este segundo pico pode ser resultado de uma disseminação horizontal para aves soronegativas dentro do lote, ou por um período prolongado de incubação em algumas aves, e também devido a associação do VAIG com outros agentes tal como o vírus de Gumboro e devido a infecção bacteriana secundária.

3.1.3. Patogenicidade

Apesar de poucos dados disponíveis quanto à variação na patogenicidade de amostras do VAIG, há alguns relatos de amostras do vírus de maior patogenicidade. Goryo identificou no Japão uma amostra do VAIG, a TK 5583, mais patogênica que outras amostras japonesas do vírus. A gravidade das lesões, a mortalidade e a morbidade, podem ser bastante variáveis dependendo da amostra viral infectante (Goryo et al, 1989, citado por Pope, 1991); Rosenberger e Cloud, 1989b). Contudo, existem outros fatores além da estirpe viral que determinam a gravidade da doença, tais como:

- ✓ Título viral: A gravidade da doença está associada ao título viral a que se expõe as galinhas (McNulty et al., 1990). Quanto maior a quantidade de vírus, mais marcados os sintomas e lesões.
- ✓ Idade das aves: O desenvolvimento dos sintomas e lesões se manifestam com maior evidência em galinhas infectadas nos primeiros dias de vida. Portanto, quanto maior o número de galinhas infectadas verticalmente, maior será a excreção viral via fezes por essas aves, e maior e mais imediata a disseminação horizontal do vírus já nos primeiros dias de vida do lote. (Rosenberger e Cloud, 1989).
- ✓ Nível de anticorpos maternos: O nível de anticorpos transmitidos à progênie, número de galinhas na progênie com anticorpos passivos e a persistência destes anticorpos passivos protetores no lote (média de três semanas), determinam a susceptibilidade à doença (McNulty, 1991; Pope, 1991; Yuasa et al., 1980b).
- ✓ Associação de fatores: Fatores de ambiente, stress, e outros agentes imunossupressores como micotoxinas ou infecções virais concomitantes, tais como reovírus (McNeilly et al., 1995), Gumboro, leucose aviária e Marek, que agravam os quadros de anemia (Yuasa et al., 1980; Pope, 1991; Rosenberger e Cloud, 1989b; Otaki et al., 1988).

Matrizes sob condições de desafio com aflatoxinas provavelmente não transmitem quantidades protetoras de IgG do soro para a progênie e também de anticorpos contra VAIG verticalmente transmitidos (Pope, 1991).

- ✓ Via de Infecção: Em inoculação experimental do VAIG, fica evidente que a via parenteral (intramuscular ou intraperitoneal) (Rosenberger e Cloud, 1989b) é mais efetiva para induzir a doença. As vias nasal, oral e ocular são menos efetivas, e como consistem em vias normais de disseminação horizontal do vírus a campo, os sintomas e lesões em certos lotes podem vir a ser relativamente brandos, dependendo da associação de outros fatores determinantes da gravidade da doença.

3.1.4. Transmissão

O vírus da anemia das galinhas é transmitido verticalmente pela matriz ao embrião, infectando sua progênie (Brentano, 2000; Yuasa et al., 1983b,c) ou horizontalmente por camas contaminadas onde a disseminação do vírus é favorecida pela alta resistência do VAIG à inativação e através do contato com pintos infectados verticalmente (Yuasa et al., 1979a, 1980). Na transmissão horizontal, a principal via de infecção é oral, principalmente a partir do vírus excretado nas fezes de aves infectadas (Brentano, 2000), porém a rota de infecção não influenciou na duração da excreção viral (Hoop, 1992). Em infecções experimentais, o vírus foi isolado repetidamente e em altos títulos nas fezes de aves infectadas por até cinco semanas (Hoop, 1992), período em que as matrizes infectadas transmitem o vírus horizontalmente no lote; depois do aparecimento de anticorpos, a excreção viral de VAIG via fezes cessa. Segundo Hoop (1992), quando da reinfecção das matrizes, a excreção do VAIG se manteve por apenas quatro dias nas fezes, mas não foi detectada a presença do vírus no embrião. Os anticorpos anti-VAIG podem ser detectados de três a quatro semanas após a infecção, levando de três a cinco

semanas até que a maioria das aves dentro de um lote apresente soroconversão.

A infecção do embrião também pode ser causada pelo sêmen de machos infectados (Hoop, 1993).

Evidências sugerem que surtos clínicos da doença causados por VAIG ocorrem após infecção tardia em lotes de matrizes, que não tem anticorpos contra VAIG antes do início de produção. Os sinais clínicos não ocorrem nas matrizes, mas o vírus é transmitido verticalmente para sua progênie, que normalmente desenvolve a doença entre duas e quatro semanas de idade. A transmissão pelo ovo ocorre de oito a quatorze dias depois da infecção experimental em galinhas (Yuasa, 1983c), porém observações de campo indicam que pode ocorrer transmissão durante um período de até nove semanas, com um pico entre uma e três semanas, obviamente dependendo do desenvolvimento de imunidade no lote (Vielitz e Landgraf, 1988; Engstron e Luthman, 1984). A ocorrência de pintos afetados produzidos de ovos postos por essas matrizes por um período de três a seis semanas após a infecção inicial do lote de matrizes continua até que essas matrizes desenvolvam uma resposta imune ativa, com produção de anticorpos maternos neutralizantes, considerados protetores contra a transmissão vertical, dependendo dos níveis desses anticorpos (McNulty et al., 1989a). A exposição de matrizes ao VAIG e soroconversão durante o período de recria, previne surtos de doença da asa azul na progênie desse lote (Vielitz e Landgraf, 1988). Na maioria das vezes a exposição primária ocorre antes de as matrizes começarem a produzir, o que explica a ampla distribuição de lotes soro positivos na ausência de sinais clínicos (McNulty et al., 1988).

Anticorpos maternos conferem completa proteção contra a doença (Yuasa, et al., 1979b., Rosenberger e Cloud, 1989b). A resistência devida à imunidade passiva, contudo pode ser superada se os pintos estiverem imunossuprimidos, principalmente por outras infecções virais. Esses anticorpos normalmente

desaparecem por volta de três semanas de idade (Bullow e Schat, 1997.; Cardona e Sommer, 2003).

Matrizes experimentalmente infectadas em diferentes idades de produção não apresentam diferenças em índices produtivos, tais como: produção de ovos, peso corporal, fertilidade e eclodibilidade (Engstron e Luthman, 1984.; Vielitz e Landgraf, 1988.; McNulty, 1991b).

Os surtos normalmente ocorrem em progênie de lotes de matrizes com idade de 25 a 38 semanas de idade, ou seja, no período de pico de produção (Engstron e Luthman, 1984; Schat, 2004). Isto pode ser explicado pela ativação do vírus latente pelo "stress" de produção ou por mudanças hormonais. Segundo Schat (2004) o VAIG pode permanecer nos tecidos das gônadas por pelo menos 40 semanas depois da soroconversão. Além disso, o agente também foi detectado nos tecidos das gônadas na ausência de soroconversão (Cardona et al., 2000a,b).

3.1.5. Imunossupressão induzida pelo VAIG:

A produção eficiente das aves depende do funcionamento adequado do sistema imune, possibilitando a defesa do organismo dos patógenos. Por essa razão, um dos principais objetivos dos geneticistas que selecionam aves de produção é o de aumentar a resistência natural às infecções (Powell, 1987; Montassier, 2000).

O sistema imunológico das aves desperta a atenção de pesquisadores e técnicos, pois as enfermidades que levam à imunossupressão se constituem em um dos mais sérios problemas que podem comprometer o bom desempenho da avicultura moderna, trazendo como principal consequência, grandes prejuízos a essa atividade econômica. Os danos às populações celulares do sistema imune vão acarretar um aumento da susceptibilidade a doenças infecciosas, parasitárias e oportunistas, gerando efeitos deletérios a médio e longo prazo, tais como: falhas na vacinação, maior taxa de condenação de carcaças e mortalidade, baixa taxa de

conversão alimentar e de produção de ovos, acarretando maiores custos com o uso de medicamentos, cujo uso é imprescindível na maioria dessas circunstâncias (Brentano, 2000; Montassier, 2000).

A característica marcante e importante da infecção pelo vírus da anemia infecciosa das galinhas é a depressão da função do sistema imunológico das aves.

Dentre as células que são susceptíveis a infecção pelo VAIG na medula óssea estão os hemocitoblastos, dos quais as células progenitoras da série eritróide e mielóide são derivadas (Adair, 2000). Em infecção experimental de pintos com um dia de idade, os hemocitoblastos na medula óssea estão entre as primeiras células em que o VAIG é detectado, cerca de 3 a 4 dias após a infecção. Eles são os alvos mais precoces do vírus, e sua destruição resulta em uma grave depleção das células eritróides e mielóides. A destruição e depleção dos hemocitoblastos na medula óssea, que é evidente oito dias após a infecção, provoca a anemia característica da doença. Os hemocitoblastos dão origem também aos trombócitos e a redução deles é provavelmente a causa do aumento do número de hemorragias intramusculares. Essas mudanças destrutivas são refletidas no sangue, onde os níveis de hematócrito e o número de leucócitos circulantes declina cerca de 8 dias pi, devido ao decréscimo do número de eritrócitos, linfócitos e heterófilos. Somente 16-18 dias pós infecção a atividade da granulopoiese e eritropoiese é restaurada na medula óssea (Adair, 2000; Todd, 2000).

As células progenitoras dos linfócitos T no timo são particularmente susceptíveis ao VAIG e parecem ser o principal alvo do vírus, não acarretando os mesmos danos às células B e seus precursores comparável à dramática depleção no número de células T é observada durante a infecção.

Dessa forma, os hemocitoblastos da medula óssea, os timócitos e os linfócitos em divisão são as principais células-alvo para a replicação do VAIG. Defeitos na função dos macrófagos na infecção por VAIG *in vivo* e

in vitro, redução nas concentrações de macrófagos no baço, níveis reduzidos de transformação de linfócitos e produção de linfocinas, e na produção de interferon e interleucina-2 por esplenócitos tem sido também relatadas (McConnell et al., 1993a,b).

Esse conjunto de alterações compromete a competência do sistema imune, aumentando a predisposição à infecções oportunistas ou secundárias por bactérias e fungos, a exemplo das dermatites associadas a surtos da anemia, edema maligno, colibacilose e aspergilose pulmonar muitas vezes observadas, reduzindo a resposta imune a outras infecções bacterianas e virais assim como comprometendo os níveis de respostas imunes vacinais (Adair et al, 1993).

Além das evidências observadas *in vitro*, o efeito imunossupressor do vírus é demonstrado também a campo pelas evidências para a quebra de respostas a vacinações contra a doença de Marek devido a grave redução da resposta imune celular (mediada por linfócitos T) ao vírus vacinal HVT, resultando em uma síndrome de alta mortalidade similar à causada por cepas variantes muito virulentas do vírus de Marek (Otaki et al., 1988; McNulty et al., 1991). São relatadas também reduzidas respostas imunes humorais a vacinação ao vírus de Newcastle (Box et al, 1988, citado por Pope, 1991), agravamento dos problemas respiratórios nas aves mesmo por cepas vacinais atenuadas do vírus de Newcastle (DeBoer et al., 1994) e efeito sinérgico no agravamento da patogenia de outros vírus imunossupressores em aves, como reovírus e vírus da doença de Gumboro (McNulty, 1991a).

3.1.6. Resistência de idade à doença

Uma importante característica da infecção pelo VAIG é a resistência de idade ao desenvolvimento da doença. Em aves imunologicamente competentes, a resistência associada à idade se estabelece entre duas a três semanas de idade, dependendo da virulência da estirpe infectante (McNulty, 1991b). A infecção

parenteral do vírus em aves SPF, livres de anticorpos contra o VAIG, demonstra que o vírus é patogênico especialmente em pintos de um dia de idade, com incidência de anemia em até 100% de aves experimentalmente inoculadas dos um aos quatro dias de idade, enquanto aves inoculadas após duas semanas de idade se infectam com o vírus, mas desenvolvem infecção subclínica, caracterizada pela ausência de sintomas ou lesões e acompanhada de soroconversão. Aves infectadas com VAIG em idades maiores tem uma capacidade de soroconversão muito rápida, aproximadamente quatro a sete dias, enquanto aves infectadas nos primeiros dias podem necessitar de duas a três semanas para ter anticorpos. O mecanismo da resistência de idade a doença clínica está relacionado à proteção conferida por anticorpos bursa dependentes. Embriões bursectomizados continuam susceptíveis a doença, desenvolvendo lesões, mesmo quando infectados com 21 ou 28 dias de idade (Cloud et al., 1992). Este vírus ou outros agentes imunossupressores, ao comprometerem a bursa, deprimem a resposta de anticorpos das aves, podendo assim, induzir a quadros de anemia também em aves infectadas após duas ou três semanas de idade .

3.1.7. Interações do VAIG com outros agentes

Entre os numerosos agentes imunossupressores em aves se encontram vírus, bactérias, toxinas, produtos químicos, deficiências nutricionais e fatores de ambiente e de manejo. Estes fatores podem atuar direta ou indiretamente no sistema imune (Montassier, 2000; Brentano, 2000).

Uma inoculação experimental de VAIG nos primeiros oito dias de vida suprime a imunidade vacinal contra a doença de Marek, HVT, provocando um quadro de mortalidade similar ao causado pelas estirpes muito virulentas do vírus da doença de Marek (Otaki et al., 1988). Também se tem estudado o efeito da inoculação do VAIG em aves vacinadas contra Marek e não desafiadas. Quando a infecção foi

realizada no primeiro dia, a mortalidade atingiu quase 100% no grupo com ambos os vírus e de 69% no grupo somente com VAIG.

Infecção dupla com a amostra S1133 de reovírus e a amostra Cux-1 de VAIG resultou em aumento na incidência e na severidade de lesões em comparação com grupos de pintos inoculados com os vírus isoladamente (McNeilly et al., 1995).

A inoculação de VAIG no primeiro dia de vida em aves SPF vacinadas via spray com a estirpe La Sota do vírus da doença de Newcastle (ND), provocou um quadro respiratório grave, uma mortalidade de 23,8% às duas semanas e de 31,3% às quatro semanas com diminuição do hematócrito quando comparada com aves vacinadas com o ND porém não inoculadas com VAIG (De Bôer et al., 1994).

Pintos com um dia de idade inoculados com vírus de Gumboro tem aumento do período de susceptibilidade, da gravidade e duração da doença produzida pelo VAIG quando comparados com as aves inoculadas com cada vírus isoladamente. A resistência da idade à doença é essencialmente eliminada em aves mais velhas, que podem apresentar a forma clínica da doença até por uma idade superior a quatro semanas (Rosenberger e Cloud, 1989b; Yuasa et al., 1980).

Em condições convencionais de campo, as aves podem estar expostas a múltiplos patógenos simultaneamente. Em todos os casos, a severidade do impacto clínico e econômico causado pelo VAIG depende das múltiplas interações entres esses agentes infecciosos e/ou imunodepressores.

3.1.8. Impacto econômico

A forma clínica da doença causada pelo VAIG ocorre quando pintos susceptíveis, sem anticorpos maternos, se infectam antes de duas semanas de idade. Ela se apresenta de forma aguda, com mortalidade de até 60%, sendo mais comum mortalidade de 5 a 10% do lote. Sob essas

condições, o vírus é transmitido verticalmente para a progênie, que desenvolve a doença entre 10 a 14 dias de idade. McIlroy et al. (1992) demonstraram que não houve diferença significativa na produção de ovos, fertilidade, percentual de eclodibilidade e mortalidade entre o lote que transmitia o vírus verticalmente (infectado depois do início de postura) e do lote considerado normal. Já na progênie desses lotes, os custos associados ao tratamento antibiótico das infecções bacterianas secundárias foi mensurada. Os dados obtidos revelam que os lotes afetados tiveram um lucro líquido de 17,3 a 19,6% inferiores do que em lotes normais. As médias de ganho de peso foram até 3,3% mais baixas, podendo haver mais grave depressão no ganho de peso médio ao abate entre 7 e 13% (Chettle, 1989, citado por McIlroy et al., 1992). A média de mortalidade (com pico às três semanas) foram entre 2 a 2,3% mais altas nos lotes afetados, quando comparados ao lote normal. A variância na distribuição de peso ao abate com seis semanas, ou seja, a desuniformidade do lote, foi significativamente maior no lote afetado.

Os efeitos econômicos de surtos esporádicos de infecções clínicas com VAIG podem ser comparados à forma mais prevalente da doença, que é a forma subclínica (McIlroy et al., 1992). Mais de 50% de lotes de frangos clinicamente normais no Canadá e no Reino Unido possuíam anticorpos contra VAIG antes do abate. Esta soroconversão presumidamente ocorre devido a infecção via horizontal, originada de contaminação de lotes anteriormente criados no mesmo galpão, pela excreção do vírus por um pequeno número de pintos infectados verticalmente, ou de uma introdução externa do vírus, desenvolvendo porém, uma infecção subclínica e, subsequente imunidade ativa contra o vírus.

Em infecções subclínicas, houve uma redução de 13% no lucro líquido. Uma mortalidade 2,5% maior, e uma conversão alimentar 2,0% maior, comparando-se lotes com presença de anticorpos contra o VAIG, com lotes sorologicamente negativos na

idade do abate. Não houve diferenças significativas nos índices de mortalidade (McNulty, 1991). A diferença existente nas perdas entre lotes clinicamente e subclínicamente afetados demonstra claramente que a ocorrência da doença clínica acarreta maiores prejuízos econômicos, porém, a maior prevalência da doença subclínica origina maior prejuízo na produção.

O curso subclínico da doença também resulta em efeitos adversos na função de macrófagos através da redução na expressão de receptores Fc, reduzindo sua capacidade de fagocitose para eliminação de microorganismos e alterando a apresentação de antígenos, função necessária para indução de resposta imune. Há ainda uma redução na produção de interleucina 1 por ambos linfócitos e macrófagos, citocina que é essencial no desenvolvimento e regulação da resposta imune e na maturação de linfócitos (McConnel et al., 1993a). Dessa forma, mesmo infecções subclínicas potencialmente resultam em alteração da função imune, aumentando a susceptibilidade a outras infecções que ajudam a reduzir a performance.

Pintos susceptíveis alojados com aves inoculadas e com quadro clínico da doença, não desenvolveram anemia, mas todos tinham desenvolvido anticorpos no soro aproximadamente aos 30 dias pi (McNulty et al., 1989a).

3.1.9. Diagnóstico

O diagnóstico da presença de infecção ativa pelo VAIG é feito pelo isolamento do vírus em células MSB-1 ou *in vivo* em pintos SPF de 1 dia de idade. Esse isolamento pode ser feito em aves SPF (Brentano., 1991; Brentano et al., 1999), isolamento em cultivo celular ou em ovos embrionados.

O diagnóstico sorológico positivo indica a exposição das aves ao VAIG e os testes utilizados para evidenciar soroconversão incluem a imunofluorescência indireta (IFA) (Yuasa et al., 1983a; Yuasa et al., 1985), imunoperoxidase (IP), testes de

soroneutralização (SN) (Jorgensen, P.H., 1992) em cultivo celular e ELISA, que apresentou boa correlação com o teste padrão de IFA (Todd et al., 1990). Os testes de IFA, IP e SN são bastante demorados, exigem adequada estrutura laboratorial de cultivo celular e experiência para interpretar corretamente os resultados e têm sido, portanto, menos utilizados do que testes de ELISA. Outro problema relacionado ao emprego da IP na detecção direta do VAIG é a ocorrência de falta de imunoreatividade nos tecidos processados com reagentes normalmente usados na fixação ou tempo de fixação inadequados. (Smyth et al., 1993).

Os testes de ELISA, por permitirem resultados bastante rápidos e o processamento de um grande número de amostras e também por quantificarem os níveis de anticorpos no soro, tem sido amplamente aplicados para o monitoramento sorológico de plantéis de matrizes, que é uma medida necessária para estabelecer o status imune dos lotes. Com base no monitoramento, é possível estabelecer a necessidade de adotar e delinear estratégias de controle baseadas na imunização. A sorologia é o método mais indicado para monitoria da presença do vírus e dos níveis de imunidade no plantel.

Embora os sinais clínicos e lesões em pintos afetados auxiliem no diagnóstico presuntivo, o diagnóstico definitivo envolve o isolamento viral ou a demonstração de antígeno vírus-específico em esfregaço de impressão de tecido e seções criostáticas (Hoop, et al., 1991; McNeily et al, 1991; Smyth et al., 1993). A infecção pode também ser diagnosticada por detecção de DNA viral por "dot blot", hibridização *in situ* ou técnicas de PCR (Bullow e Schat, 1997). A PCR foi considerada a técnica mais sensível de detecção do VAIG quando comparada com testes como o isolamento viral e testes de imunofluorescência em seções de tecidos ou hibridização em "dot-blot" (Soine et al., 1993). É também mais sensível do que o cultivo *in vitro*, já que o VAIG apresenta isolados incapazes de crescer em cultivo celular.

O diagnóstico por PCR permite a detecção de VAIG por meio de amplificação de segmentos do genoma do vírus presentes em órgãos de aves infectadas, através da utilização de inicializadores específicos a seqüências de DNA já conhecidas de cepas padrão de VAIG. O DNA pode ser extraído das células e tecidos por diferentes metodologias e amplificado em temperaturas e ciclos determinados em conformidade às seqüências de inicializadores utilizados e ao grau de especificidade que se quer do teste (Brentano, 2000)

N laboratório de Virologia da Embrapa Suínos e Aves- SC foi implantado um PCR baseado na amplificação de um segmento de 695 nucleotídeos do gene que codifica a proteína VP1 do vírus, empregando inicializadores previamente descritos na literatura. Também delinearam inicializadores para amplificação de 714 nucleotídeos abrangendo o gene para VP3 e parte de VP1 para o diagnóstico de VAIG por PCR. Ambos os PCRs, baseados nas seqüências de VP1 ou VP3, permitem a detecção do VAIG em órgãos como timo, baço, fígado ou bursas em material de campo assim como em aves experimentalmente inoculadas com amostras de campo (Brentano, 2000).

3.1.10. Prevenção e Controle

A AIG se manifesta apenas em aves infectadas nas primeiras semanas de vida, principalmente em consequência da transmissão vertical do vírus, enquanto que aves adultas, apesar de susceptíveis à infecção soroconvertem, mas não desenvolvem a doença clínica. Assim, o controle da anemia infecciosa das galinhas é baseado na transferência passiva de imunidade das matrizes à progênie (Brentano et al., 2000; Todd, 2000).

Deve-se lembrar que as matrizes devem desenvolver imunidade adequada, mediada por anticorpos neutralizantes, antes do início do período de postura, para transferência passiva via ovo, de anticorpos maternos em níveis suficientes para prevenir a transmissão vertical do vírus à

progênie, reduzindo assim a ocorrência de surtos da doença a campo.

Desta forma, fica evidente a necessidade de uma monitorização constante para avaliar o status imune do lote de matrizes antes do início de postura, com aproximadamente 16 a 18 semanas de idade para garantir a uniformidade imunológica no lote e obtenção de níveis de anticorpos maternos adequados para proteção da progênie. Com esta monitoria, pode-se adotar medidas estratégicas de imunização, tal como a vacinação, que deve ser feita no máximo até quatro semanas antes do início da postura para evitar riscos de transmissão vertical do vírus vacinal à progênie.

A quantificação das perdas associadas com infecções subclínicas requer maiores estudos e considerações sobre a possibilidade de controlar e diminuir essas perdas, através do uso de vacinas vivas atenuadas em frangos de corte, ou uma vacina inativada em matrizes.

O controle da anemia envolve também o controle de outros agentes imunossupressores, uma vez que estes aumentam sinergicamente a gravidade de surtos da doença. Entre estes, os mais comuns são principalmente, o efetivo controle vacinal da doença de Marek, controle da doença de Gumboro, o uso de rações e subprodutos livres de micotoxinas e melhoria das técnicas de manejo e ambiência.

Não há tratamento específico contra o vírus. Tratamento antibiótico pode ser aplicado para reduzir o impacto de infecções bacterianas secundárias, tais como as dermatites, colibaciloses, entre outras. Pode ser aplicada a desinfecção de aviários com hipoclorito de sódio ou iodo em concentrações de 10%, ou também, vassouras de fogo, para buscar reduzir a carga infectiva, mas as desinfecções não garantem a eliminação VAIG do ambiente.

3.2. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Através do ELISA é possível determinar o perfil sorológico de populações avícolas e fazer o monitoramento dos programas de vacinação de uma maneira rápida (Santos e Silva, 2000) e altamente sensível (Miers et al., 1994). Os testes de IFA, IP e SN são bastante demorados, exigem adequada estrutura laboratorial de cultivo celular e experiência para interpretar os resultados. Os testes ELISA, por permitirem um resultado mais rápido e a análise de um grande número de amostras, tem sido amplamente aplicados para o monitoramento de VAIG nos plantéis.

3.3. Reação de Polimerase em cadeia (PCR)

A PCR pode ser utilizada para detectar e amplificar DNA/RNA em qualquer material clínico que contenha o ácido nucléico do agente suspeito: tecidos coletados em biópsias/necrópsias, soro/plasma, células sangüíneas, secreções (leite, saliva, secreções nasais, urina, sêmen), em sobrenadante ou em células de cultivo, inoculadas com o material suspeito. Em qualquer desses casos, o ácido nucléico (RNA ou DNA) deve ser previamente extraído do material clínico, para a sua posterior análise. Entre as principais vantagens dessas técnicas está a sua capacidade de detectar ínfimas quantidades do genoma, além de microrganismos que já perderam a viabilidade e não são mais infecciosos.

A PCR é uma técnica poderosa baseada na multiplicação exponencial, *in vitro* de um segmento de DNA por uma DNA polimerase termoestável, em um processo repetitivo de aquecimento e resfriamento (30 a 40 vezes). Nessa reação são utilizadas duas seqüências de oligonucleotídeos (inicializadores) que hibridizam nas fitas opostas de DNA, e delimitam a região a ser amplificada. O caráter exponencial deste processo se deve ao fato de os produtos sintetizados em cada ciclo atuarem como molde no próximo ciclo, por isso, o número de seqüências ampliadas duplica após cada

ciclo. Teoricamente, 30 ciclos de amplificação produzem 10^9 cópias da molécula alvo. Na prática, porém, a eficiência é menor, devido a inativação da enzima e a presença de quantidades limitadas de componentes no final do processo de amplificação. Tanto o DNA quanto o RNA podem ser utilizados como molde para amplificação.

O diagnóstico por PCR permite a detecção de VAIG de forma rápida e específica por meio de amplificação do genoma do vírus presente em órgãos de aves infectadas, através da utilização de inicializadores específicos para a seqüência de DNA conhecida do genoma de amostras padrão de VAIG (Tham e Stanislawek, 1992). O nested PCR, pela sua maior sensibilidade também pode ser utilizado para o diagnóstico de VAIG (Soiné et al., 1993).

O teste de PCR permite um diagnóstico rápido da infecção pelo vírus da anemia infecciosa das galinhas, cuja identificação é importante para que sejam tomadas decisões quanto à adoção ou avaliação de práticas de manejo e imunização de matrizes na tentativa de controle de surtos da doença.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Local de realização dos experimentos

A parte laboratorial utilizando a técnica de ELISA foi realizada no Laboratório do Setor de Doenças das Aves, no Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais.

A técnica de PCR foi realizada no laboratório Simbios Biotecnologia, em Canoas – RS, que é credenciado pelo Ministério da Agricultura para execução de diagnóstico de VAIG.

4.2. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

4.2.1. Soros testados

Soros de aves matrizes pesadas em diferentes fases do seu ciclo de produção, foram testados pela técnica ELISA. As aves pertenciam a uma empresa produtora de pintos de um dia e ovos férteis localizada na região centro-oeste de Minas Gerais.

As amostras de soro foram obtidas em julho de 2003, para os lotes em idades de produção, e em janeiro de 2004 para os lotes em idade de recria. No lote de recria que houve repetição de coleta, sendo dado um intervalo de seis e outro de cinco semanas respectivamente entre uma coleta e outra.

Utilizando seringas de três ml com agulha de 25 x 8, foi coletado sangue da veia da asa das aves. Estas amostras foram deixadas à temperatura ambiente, até que o soro estivesse totalmente separado do coágulo. Cada amostra de soro foi transferida para um tubo de microcentrífuga "eppendorf", separados de acordo com o lote de matrizes correspondente e armazenada a -20°C até o uso.

Os lotes foram identificados através de letras de acordo com a idade no momento da coleta e número de soros testados, conforme Tabela 1 e 2 para lotes de recria e produção, respectivamente.

Dentre os lotes de recria analisados, foram testados 20 soros de cada lote sendo que houve repetição do teste ELISA no lote C*, cujo soro dos animais foi testado com seis, doze e dezessete semanas, não sendo testadas necessariamente as mesmas aves da coleta anterior mas aves do mesmo lote.

Tabela 1. Discriminação dos lotes de recria e respectivas idades estudadas.

Identificação do Lote	Idade em semanas
A	01 dia
B	03
C*	06
C*	12
C*	17
D	17
E	21

* Lote foi testado com 06, retestado com 12 e novamente retestado com 17 semanas de idade.

Tabela 2. Discriminação dos lotes e respectivas idades de produção com número de soros testados.

Identificação do lote	Idade em semanas	Nº de soros coletados e testados
F	28	36
G	33	36
H	43	36
I	55	35
J	62	39

4.2.2. Execução do ELISA

A execução do ELISA foi feita seguindo o protocolo do "Kit" comercial da empresa IDEXX. O "FlockChek" CAV, é um ensaio imunoenzimático competitivo para detecção de anticorpos contra o vírus da Anemia Infecciosa das Galinhas (VAIG) em soro de galinhas. Uma representação esquemática do teste pode ser vista na Figura 1.

O ensaio foi realizado em microplacas de 96 pocinhos revestida com o antígeno VAIG, sendo quatro pocinhos utilizados para os controles positivos e negativos. As amostras de soro em teste foram diluídas em proporção 1:10 com diluente de amostra do "Kit" e incubadas a 37°C por uma hora em câmara úmida. Após a lavagem foi adicionado às microcavidades um conjugado composto de anticorpos monoclonais contra VAIG, marcado com a enzima peroxidase e a placa foi incubada a 37°C por 30 minutos.

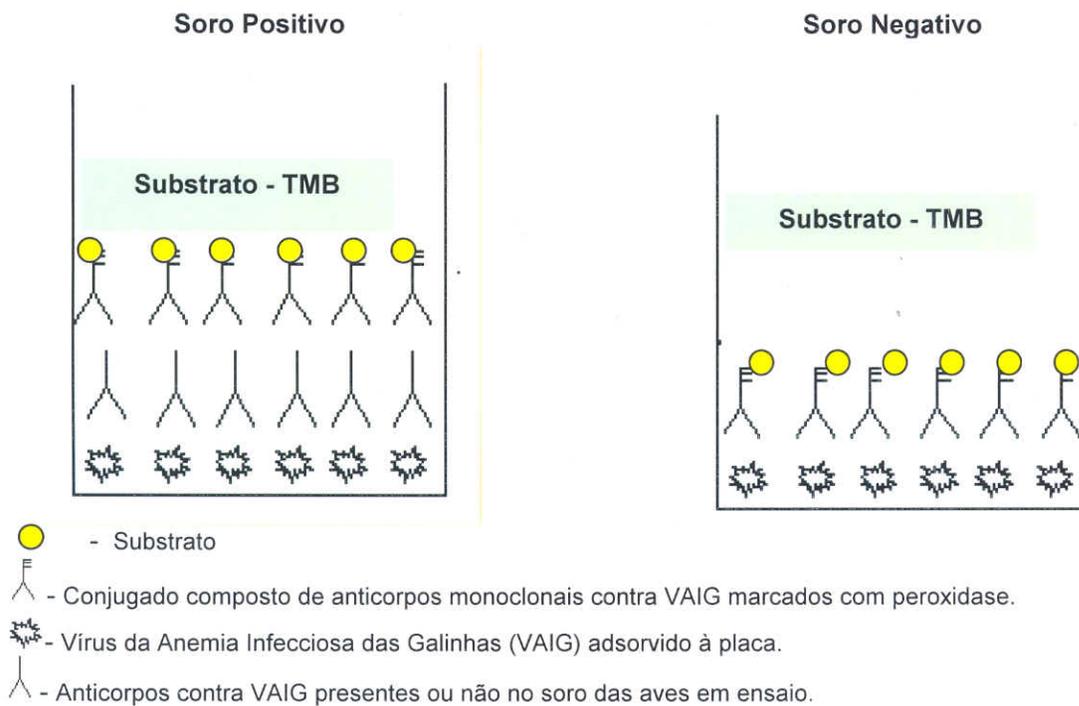


Figura 1. Ilustração esquemática do princípio do ELISA competitivo utilizado para detecção de anticorpos contra o VAIG em soro de galinhas. (Idexx, EUA)

Na ausência de anticorpos anti-VAIG no soro, o conjugado anti-VAIG estaria livre para reagir com o antígeno fixo na fase sólida e nas amostras positivas, os epitopos do vírus estariam bloqueados pelos anticorpos presentes no soro e não haveria ligação do conjugado. Após nova lavagem, a solução de substrato TMB foi distribuída em cada cavidade, incubando-se novamente a 37°C por 15 minutos em câmara úmida.

Na presença de enzima, o substrato é convertido em um produto de cor azul. As microplacas foram lidas em leitor de ELISA (Microplate Reader, Model 550, Bio-Rad, EUA) com filtro de comprimento de onda de 650nm.

Os controles do "Kit" não foram diluídos e foram testados em duplicatas, de acordo com as recomendações.

4.2.3. Interpretação de resultados do ELISA

Para classificar o soro testado como positivo ou negativo para VAIG foi feito o cálculo onde a leitura da absorvância no comprimento de onda de 650 nm, (A650) de cada amostra foi dividida pela média dos controles negativos, resultando no valor chamado S/N. A quantidade de anticorpos contra o VAIG presente nos soros é inversamente proporcional à leitura da densidade óptica (OD) e, conseqüentemente, ao valor S/N. A presença de anticorpos VAIG indica exposição prévia ao VAIG.

Para validar o teste, as ODs dos controles negativos lidas no comprimento de onda (A650nm) deve ser maior ou igual a 0,60 e o S/N do controle positivo deve ser menor ou igual a 0,50.

O ponto de corte do ELISA é estabelecido no valor S/N de 0,6 ou seja, os grupos com razão S/N superiores a 0,6 são considerados negativos e entre 0 a 0,6 são considerados positivos para presença de anticorpos contra o VAIG.

4.3. Reação de Polimerase em Cadeia – PCR

Para realização do PCR, foram utilizados ovos férteis de matrizes pesadas em produção oriundos de lotes de 28 a 62 semanas de idade, cujo soro foi coletado no mesmo intervalo de tempo, como mostrado na Tabela 2.

4.3.1. Obtenção dos ovos e embriões para detecção do VAIG por PCR.

Logo após o término da coleta de soro das aves indicadas na Tabela 2, as mesmas foram separadas em compartimentos situados no final de cada galpão, específicos para cada lote, e colocadas com machos dos mesmos lotes na proporção de um macho para cada 10 fêmeas. Os ovos postos por elas durante o decorrer da semana de 30 de julho de 2003 a 05 de agosto de 2003, foram coletados, marcados um por um com a numeração do lote correspondente, estocados em local com temperatura e umidade adequados, até serem levados para o incubatório da empresa.

Após 20 dias de incubação, esses ovos foram retirados da máquina de eclosão, foi feita a ovoscopia e constatou-se que todos tinham embriões, então foram congelados a -20°C até o processamento no laboratório Simbios Biotecnologia.

A identificação dos lotes correspondeu à mesma nomenclatura utilizada para o ELISA.

Foram levados para análise 30 ovos de cada lote. Desses ovos foram analisados 6 amostras por lote, sendo que cada amostra correspondia a 5 "pools" de embriões retirados destes ovos, totalizando 6 análises de embriões por lote de matrizes testadas.

4.3.2. Metodologia

A seguir, está descrita de forma resumida, a técnica de PCR utilizada no laboratório Simbios.

Inicialmente, retirou-se os embriões dos ovos e fez-se um macerado do conteúdo abdominal dos mesmos, incluindo baço, fígado e Bursa de Fabricius, macerando-se até obter um conteúdo homogêneo.

As amostras maceradas foram incubadas por 1 h a 65°C, quando 100 µl de cada amostra foram misturados numa solução contendo 100 µl de tampão de lise 5X (5% SDS E 0,05 M EDTA) e 100 µg/ml de proteinase K (Amresco, Solon, OH - EUA) num volume final de 500 µl, completado com água estéril. O DNA foi extraído com fenol: clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) seguido por uma extração com clorofórmio. O DNA foi precipitado com isopropanol em presença de acetato de sódio 3M por 1 h a 20°C e sedimentado por centrifugação por 10 minutos a 14.000 rpm (centrífuga eppendorf 5417R). Posteriormente foram realizadas lavagens com etanol 70% seguido de solubilização do DNA em 50 µl de água destilada. Para montagem das reações, 1 µl do DNA purificado foi adicionado num volume final de 50 µl de tampão de PCR (1,5 mM MgCl₂; 0,25 mM de dATP, dTTP, dGTP e dCTP, 1.5 U Taq DNA polimerase e 25 pmol de cada iniciador). Na reação realizada utilizou-se inicializadores localizados na região repetitiva terminal do vírus sendo os iniciadores externos: VAIG-1 5' – TCG CGA TTC GTC GAA GGC GGG – 3' e VAIG-2 5' – TCC CGT GCA TCC ACC CGG ACC – 3', e os iniciadores utilizados no "PCR-Nested" VAIG 3F 5' – CGG AGG CCC CCC GGT GGC – 3' e VAIG 4R 5' - ACT GCC GAC CGG TAT GTG CGC – 3'.

A amplificação foi realizada utilizando o termociclador 9700 (Applied Biosystems, EUA) utilizando o seguinte programa: desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos e 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 20 segundos, anelamento a 55°C por 40 segundos, extensão a 72°C por 60 segundos, finalizando a 72°C por 5 minutos.

Os fragmentos amplificados tinham o tamanho esperado de 289 bp e 228 bp para as PCRs externas e "nested", respectivamente. A visualização dos segmentos amplificados por PCR foi feita em gel de poliacrilamida 10% corado com nitrato de prata, segundo Sanguinetti et al. (1994).

O controle positivo foi constituído de DNA extraído de amostra vacinal atenuada P4 (Intervet) crescida em cultura de células, previamente titulada e quantificado para determinar a concentração de DNA-alvo e, quando necessário, diluído para se determinar o limite de sensibilidade do ensaio.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. ELISA

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, os levantamentos sorológicos demonstraram uma ampla distribuição de anticorpos ao VAIG durante o ciclo produtivo de uma mesma granja de matrizes pesadas, com faixas etárias pertencendo a núcleos diferentes, mostrando um aumento do número de soropositivos com o aumento da idade dos animais.

A Figura 2 mostra a porcentagem de animais soropositivos e negativos considerando o total de aves testadas nas idades entre um dia a 62 semanas de idade.

Os inicializadores utilizados pelo laboratório se ligam em região conservada do genoma, a região única repetitiva terminal. Em estudo que fizemos com seqüências disponíveis nos bancos de dados (www.ncbi.nlm.nih.gov), observamos que esses iniciadores poderiam detectar amostras vacinais ou amostras de campo. Foram alinhadas várias seqüências e testada a ligação dos iniciadores em relação às mesmas e constatamos que os iniciadores reconheceram todas as amostras.

Embora a PCR tenha sido feita na forma de "pools" de seis amostras, o que poderia sugerir a diminuição na possibilidade de detectar o vírus nestas amostras por diluição de amostras DNA positivas, acredita-se que devido ao alto grau de sensibilidade da técnica de "Nested-PCR" seriam detectadas pequenas quantidades de DNA viral. Este trabalho é comparado ao de Miller et al. (2003), no qual foram feitos "pools" de órgãos linfóides de embriões com 16 a 19 dias de incubação, conseguindo-se detectar o DNA viral pela reação de "Nested-PCR".

De acordo com os resultados deste trabalho, os lotes de matrizes pesadas com altos títulos de anticorpos não transmitiram o vírus para a progênie. Estes achados concordam com o trabalho de Hoop, 1992 que concluiu que fêmeas de postura experimentalmente infectadas transmitiam o vírus à progênie até desenvolverem anticorpos contra VAIG, entre 8 a 14 dias após a inoculação. Mesmo neste caso, o percentual de prole infectada foi menor que 10%. Apesar de haver lotes que segundo os resultados do ELISA ainda possuem animais com níveis de anticorpos não protetores, ou seja, que ainda tem capacidade de transmitir o vírus verticalmente, é provável que não se tenha detectado o vírus em função da baixa taxa de transmissão vertical. De acordo com o **Yuasa (1983c)**, a proporção de pintos verticalmente infectados é baixa. Em trabalhos com aves SPF, a transmissão via ovo foi detectada durante os primeiros 14 dias pós inoculação experimental de um

total de 29 dias de amostragem, e a taxa de detecção em pintos infectados foi de 7,5%.

O trabalho de Cardona et al. (2000a), porém, contrasta com nossos resultados, pois estes autores conseguiram detectar vírus de embriões provenientes do acasalamento de fêmeas soropositivas com machos soropositivos, indicando que o VAIG pode ser transmitido verticalmente ao embrião por até 12 semanas depois que os pais se tornam soropositivos e que a presença de anticorpos não elimina o vírus dos tecidos reprodutivos nem previne a transmissão vertical. Porém estes autores, diferentemente do nosso trabalho, só qualificam os pais como positivos ou negativos, não quantificando se os níveis de anticorpos são protetores ou não, o que poderia estar determinando a transmissão vertical do vírus.

6. CONCLUSÕES

Em lotes de matrizes pesadas, com 97,22 a 100% de animais soropositivos e soroprotetores para o VAIG determinados através do ELISA, não houve transmissão de vírus para a progênie testada.

A soroconversão, na granja testada, ocorreu pela infecção natural das aves com o vírus, antes do início de postura em mais de 90% dos animais testados.

A conversão sorológica para o VAIG nesta granja ocorreu provavelmente entre 12 a 15 semanas, demonstrado pelo início da detecção de aves soropositivas às 17 semanas de idade.

7. REFERÊNCIAS

ADAIR, B. M.; McNEILLY, F.; McCONNELL, C. D. G. et al. Effects of chicken anemia agent on lymphokine production and lymphocyte transformation in experimentally infected chickens. *Avian Diseases*, v.35, n.4, p.783-792, 1991.

ADAIR, B. M.; McNEILLY, F.; McCONNELL, C. D. G.; McNULTY, M. S. Characterization of surface markers present on cells infected by chicken anemia virus. *Avian Diseases*, v.37, n.4, p.943-950, 1993.

ADAIR, B. M.; Immunopathogenesis of chicken anemia virus infection. *Developmental & Comparative Immunology*, v.24, n.2-3, p.247-255, 2000.

BRENTANO, L.; MORAES, N.; WENTZ, I. et al. Isolation and identification of chicken infectious anemia virus in Brazil. *Avian Diseases*, v.35, n.4, p.793-800, 1991.

BRENTANO, L. Anemia infecciosa em galinhas. In: CONFERÊNCIA APINCO'99 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLA, 1999, Campinas. *Anais...* Campinas: FACTA, 1999, p.73-86.

BRENTANO, L. Anemia infecciosa das galinhas. In: BERCHIERI JUNIOR, A.; MACARI, M. (Eds). *Doenças das aves*. Campinas: FACTA, 2000. p.339-350.

BRENTANO, L.; SILVA, B. G.; SAYD, S.; FLORES, S. W. Anticorpos para o vírus da anemia das galinhas (VAIG) em matrizes de corte no Brasil. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, v.2, n.2, p.163-175, 2000.

BULOW, V. V.; SCHAT, K. A. Chicken infectious anemia. In: CALNEK, B. W. (Ed.). *Diseases of poultry*. 10.ed. Ames: Iowa State University, 1997. p. 739-756.

CANAL, C.W. Anemia das galinhas: uma doença ainda pouco estudada. In: SIMPÓSIO DE SANIDADE AVÍCOLA, 2., 2000, Santa Maria. *Anais...* Concórdia: EMBRAPA SUÍNOS E AVES, 2000. p.89-94.

CANAL, C. *Resultados preliminares do projeto CAV(2002)*. [s.l.]: [s.n], 2002. Disponível em: <<http://www.fortdodge.com.br/fd/aves/bannerrevista/Revista%20Aves%205/neoliber.html>>. Acessado em: 25/03/04.

CARDONA, C. J.; OSWALD, W. B.; SCHAT, K. A. Distribution of chicken anaemia virus in the reproductive tissues of specific-pathogen-free chickens. *Journal of General Virology*, v.81, p.2067-2075, 2000a.

CARDONA, C. J.; LUCIO, B.; O'CONNEL, P.; JAGNE, J.; SCHAT, K. A. Humoral immune responses to chicken infectious anaemia virus in three strains of chickens in a closed flock. *Avian Diseases*, v.44, n.3, p.661-667, 2000b.

CARDONA, C. J.; SOMMER, F. Chicken anemia virus in broilers: dynamics of the infection in two commercial broiler flocks. *Avian Diseases*, v.47, n.4, p.1466-1473, 2003.

CLOUD, S.S.; ROSENBERGER, J.K.; LILLEHOJ, H.S. Immune dysfunction following infection with chicken anemia agent and infectious bursal disease virus. II. Alterations of in vitro lymphoproliferation and in vivo immune responses. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.34, n.3-4, p.353-366, 1992.

DAVIDSON, I.; KEDEM, M.; BOROCHOVITZ, H. et al. Chicken infectious anemia virus in Israeli commercial flocks: virus amplifications, clinical signs, performance, and antibody status. *Avian Diseases*, v.48, n.1, p.108-118, 2004.

DE BOER, G. F.; VAN ROOZELAAR, D. J.; MOORMANN, R. J. et al. Interaction between chicken anaemia virus and live Newcastle disease vaccine. *Avian Pathology*, v.23, n.2, p.263-275, 1994.

ENGSTRON, B. E.; LUTHMAN, M. Blue wing disease of chickens: signs, pathology and natural transmission. *Avian Pathology*, v.13, n.1, p.1-12, 1984.

ENGSTRON, B. E.; LUTHMAN, M. Blue wing disease of chickens: experimental infection with a Swedish isolate of chicken anaemia agent and avian reovirus. *Avian Pathology*, v.17, n.1, p.33-50, 1988.

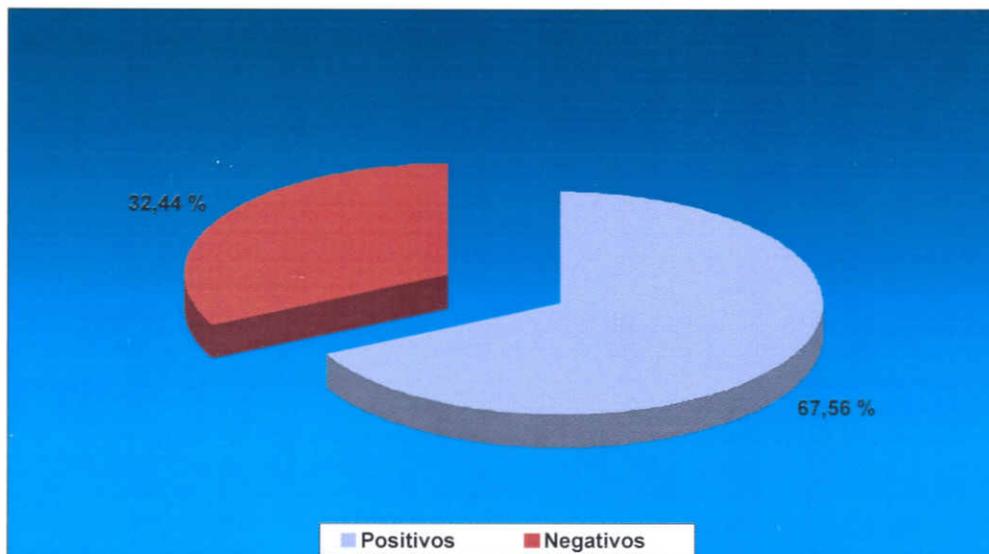


Figura 2. Taxas de animais soropositivos para o Vírus da Anemia Infecciosa das Galinhas em lotes de matrizes pesadas não vacinadas de um dia a 62 semanas de idade em diferentes fases de produção.

Observamos que 67,56% dos animais testados por ELISA foram soropositivos e 32,44% soronegativos dentro da granja.

Outros autores estudaram a incidência e distribuição de anticorpos anti-VAIG em granjas de matrizes pesadas.

Brentano et al. (2000), testou em ELISA soros de matrizes pesadas não vacinadas com idades entre seis a 70 semanas, provenientes de granjas localizadas em diferentes Estados brasileiros e observou que 89% foram positivos para VAIG, indicando a alta prevalência do vírus no Brasil, em todos os estados testados. O Estado de Minas Gerais apresentou 86% de positividade.

Canal (2002), também demonstrou que todos os lotes de matrizes pesadas não vacinados, de seis a 55 semanas de idade provenientes da Região Sul do país abrigavam animais sorologicamente positivos, sendo um total de 89,23% positivos para o VAIG.

É provável que essa diferença no percentual de positividade dos lotes entre este trabalho e os trabalhos citados, seja pelo fato de que os outros autores avaliaram lotes de diferentes granjas em forma de "pool". Não foram testados lotes de granjas individuais; lotes positivos já foram detectados a partir de seis semanas de idade. Neste trabalho foi avaliado o perfil de apenas uma granja de matrizes pesadas, de cada idade separadamente e que apresentaram alto índice de aves negativas na fase de recria, principalmente até 17 semanas de idade, o que comparando com os outros trabalhos parece indicar uma soroconversão mais tardia. Se considerarmos o percentual de positividade da granja testada no intervalo de seis a 62 semanas de idade, semelhante ao dos autores citados, a média de animais soropositivos seria de 71,07%, indicando que houve maior período de tempo sem exposição das aves ao vírus.

Os resultados das taxas de animais soropositivos e soronegativos para o VAIG em lotes de matrizes pesadas em diferentes fases de recria estão apresentados na Figura 3.

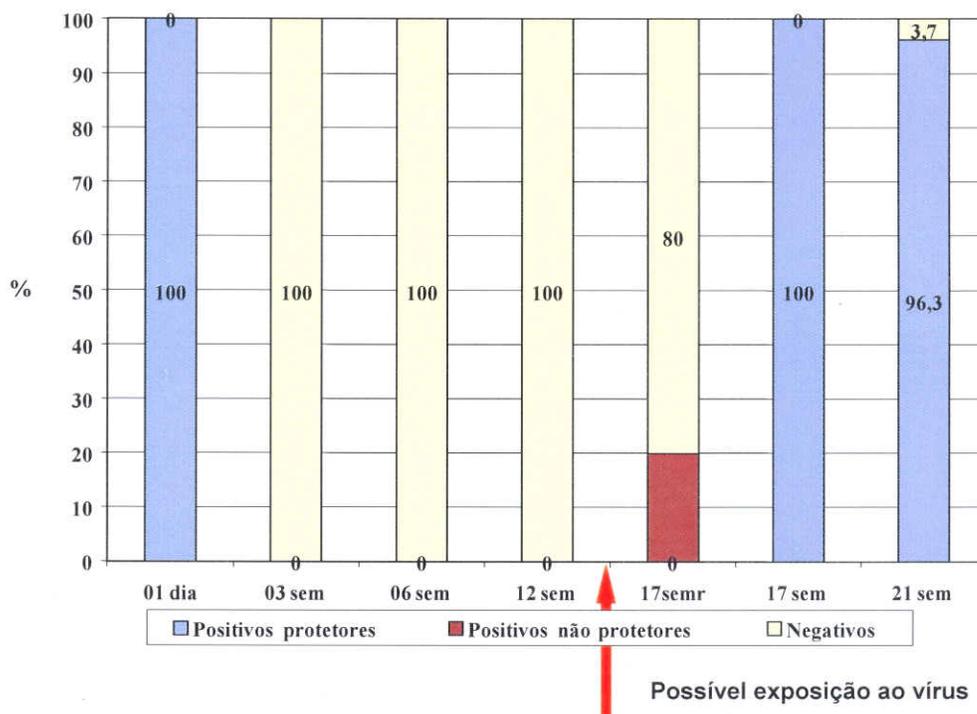


Figura 3. Taxas de animais soropositivos para o Vírus da Anemia Infecciosa das Galinhas em lotes de matrizes pesadas em diferentes fases de recria, com percentual de soros com razão S/N considerada protetora no total de anticorpos.

Observamos que todas as aves com um dia de idade tinham anticorpos contra VAIG, já que estas provêm de lotes de avós que foram vacinadas. Esses níveis de anticorpos, que eram extremamente uniformes, caíram rapidamente com a idade, sendo 100% dos animais soronegativos com três semanas.

De acordo com a literatura, esses níveis de anticorpos caem com a idade, em torno de três a quatro semanas (Otaki, et al., 1992; Bulow et al., 1997; Cardona e Sommer, 2003). Cardona e Sommer, 2003, que estudaram soroprevalência para VAIG em um lote de frangos de corte, observaram que os níveis de anticorpos maternos caíram totalmente com quatro semanas, com o lote voltando a soroconverter com cinco semanas e apresentando 100% de soroconversão já com seis semanas de idade. Neste trabalho, observamos que após a queda dos anticorpos maternos, que

ocorreu entre a primeira e a terceira semana, os lotes mantiveram-se 100% soronegativos até 12 semanas de idade, começando a soroconverter com 17 semanas. Isto pode demonstrar uma adequada biossegurança na granja de matrizes, onde não houve contato ou circulação do vírus até 12 semanas. Em lotes de frangos de corte praticamente não existe biossegurança e ainda é muito freqüente a reutilização de cama por duas ou mais rodadas de lotes, o que facilitaria a circulação e infecção natural pelo vírus precocemente após a queda de anticorpos passivos de acordo com o trabalho citado.

Segundo Cardona (2000b), o fato da ave não apresentar anticorpos após a queda da imunidade passiva, não elimina a possibilidade do vírus estar presente na granja já no momento do alojamento de pintos de um dia.

Segundo as instruções do "Kit" comercial IDEXX, os grupos com razão S/N superiores a 0,6 são considerados negativos e entre 0 a 0,6 são considerados positivos para presença de anticorpos contra o VAIG. Brentano (2000), correlacionou valores S/N em ELISA com níveis de anticorpos neutralizantes contra o VAIG em amostras de soros de galinhas e observou que os grupos da razão S/N entre 0,0 a 0,2 representam níveis de anticorpos necessários para proteção passiva da progênie e os valores compreendidos entre 0,3 e 0,6 indicam níveis baixos e insuficientes para esta proteção.

O lote C, conforme demonstrado na Tabela 2, foi testado com seis, 12 e 17 semanas, apresentando nos dois primeiros testes 100% e no último 80% de soronegativos e 20% de anticorpos presentes não protetores. Isto poderia indicar início de exposição ao vírus, com níveis de anticorpos ainda baixos. Em contrapartida, em outro lote na mesma granja, testado com 17 semanas, foi observado 100% de aves soropositivas. Supõe-se então, que provavelmente a exposição ao vírus está ocorrendo entre a 12^a e 15^a semanas, com o início da soroconversão com 17 semanas, já que segundo Hoop (1992), anticorpos anti-CAV podem ser detectados de 3 a 4 semanas após a infecção.

Como não acompanhamos os intervalos semanais seqüenciais dos lotes, não é possível precisar qual foi o período exato em que as reprodutoras entraram em contato com o vírus. Também é muito difícil precisar qual foi a fonte de infecção, se o vírus já estava na granja ou foi introduzido, porém é importante levar em conta que, de lote para lote, a idade em que ocorre a infecção não variou muito. Os resultados sugerem que as aves se infectam na recria, após 12 e antes de 17 semanas. Antes de 28 semanas, quando começa a fase produtiva, a grande maioria das aves já estaria soropositiva com elevados níveis de anticorpos considerados protetores para a progênie (Figura 3).

No nosso trabalho, não ocorreu desuniformidade no percentual de animais soropositivos e soronegativos dentro de um mesmo lote testado entre um dia e 12 semanas, já que 100% dos animais testados nessas idades foram soropositivos ou soronegativos. Observamos também que o lote com 21 semanas tinha apenas 3,7% de animais soronegativos. Porém observamos que existe desuniformidade entre lotes, já que numa mesma granja diferentes lotes de 17 semanas, testados em dois momentos diferentes, apresentaram 80% e 0% de soronegativos respectivamente (Figura 3).

Brentano (2000), estudando lotes de matrizes de corte com idades de seis a 12 semanas observou que eles apresentaram alto grau de desuniformidade nos níveis de anticorpos, com 42% de aves sorologicamente negativas, 50% das aves com níveis de anticorpos considerados protetores e 7% com níveis baixos (razão S/N 0,3 a 0,6). Essa desuniformidade entre positivos e negativos se mantém entre 13 e 18 semanas de idade, com aumento do número de aves com títulos protetores de anticorpos, que passam a 61,70% das aves nesta faixa de idade.

As Figuras 4 e 5 mostram as taxas de animais soropositivos por ELISA para VAIG e o percentual de anticorpos considerados protetores dentre estes positivos de lotes de matrizes pesadas em diferentes fases de postura. A presença de uma pequena porcentagem de aves negativas e/ou com níveis não protetores de anticorpos dentro dos lotes já em fase de postura, indica ainda haver riscos da transmissão vertical do VAIG. Uma inadequada transferência nos níveis de imunidade passiva à progênie tornaria esses pintos susceptíveis à infecção e à apresentação de sintomas clínicos nas primeiras semanas de vida, sendo que estes se tornariam fonte de contaminação horizontal dentro do lote de frangos.

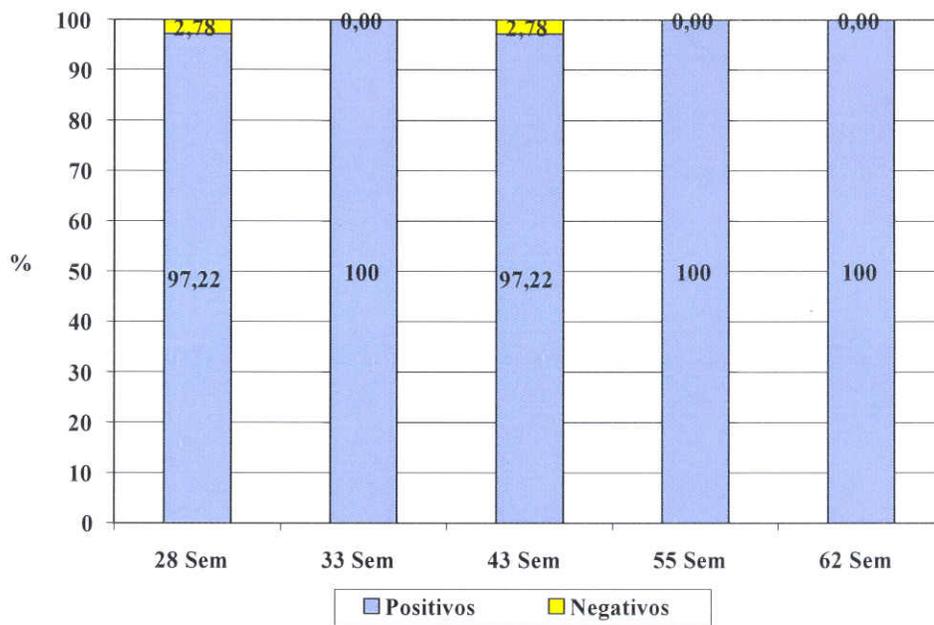


Figura 4. Taxas de animais soropositivos em ELISA para o Vírus da Anemia Infecciosa das Galinhas de lotes de matrizes pesadas em diferentes fases de postura.

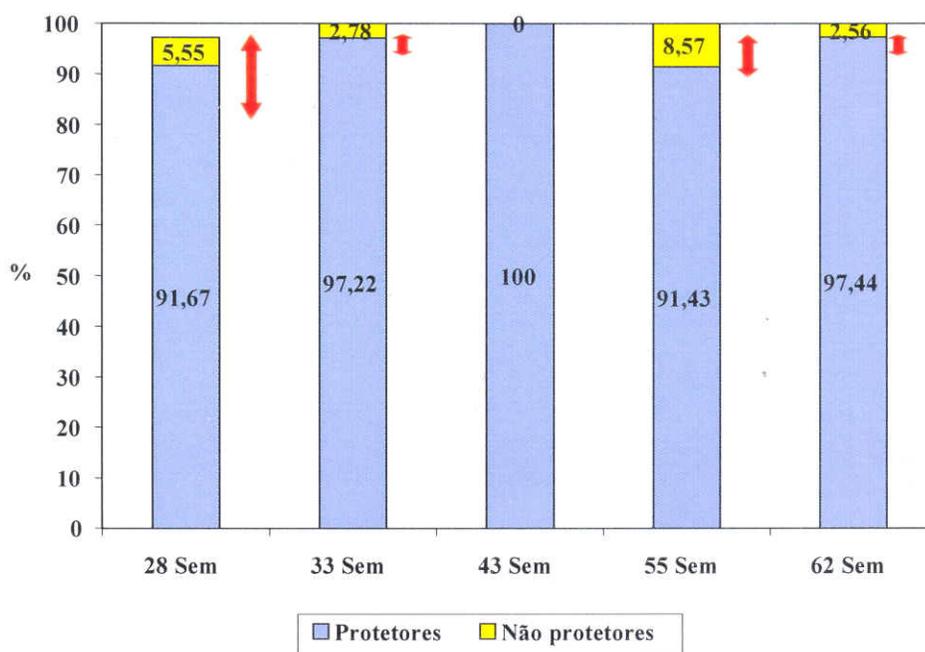


Figura 5. Taxa de animais soropositivos em ELISA para o vírus da anemia infecciosa das galinhas em lotes de matrizes pesadas em diferentes fases de postura, com percentual de anticorpos considerados protetores dentre estes positivos.

Nossos resultados concordam com os de Brentano (2000), que descreve que ainda são encontradas entre aves matrizes pesadas com 25 a 70 semanas de idade, uma média de 3,0% de aves com anticorpos no ELISA em níveis não protetores ou negativos, indicando que ainda há lotes de matrizes em produção com a presença de aves que oferecem riscos à transmissão vertical do VAIG.

Já no trabalho de Canal (2000), que analisou diferentes lotes de matrizes pesadas de seis a 55 semanas de idade em 03 Estados da região Sul do País, foi encontrado um percentual de 41,36% de

aves com títulos considerados não protetores para a progênie.

A Figura 6 resume o perfil sorológico observado na granja de matrizes desde o alojamento das aves no primeiro dia até as fases do período de produção. Notamos que há indícios de uma tendência de disseminação gradual de exposição ao vírus, culminando com uma soroprevalência média superior a 95% das aves já em idade produtiva. Os resultados individuais de cada um dos lotes testados indicaram que a população de aves negativas se limita principalmente aos lotes de três até 17 semanas de idade.

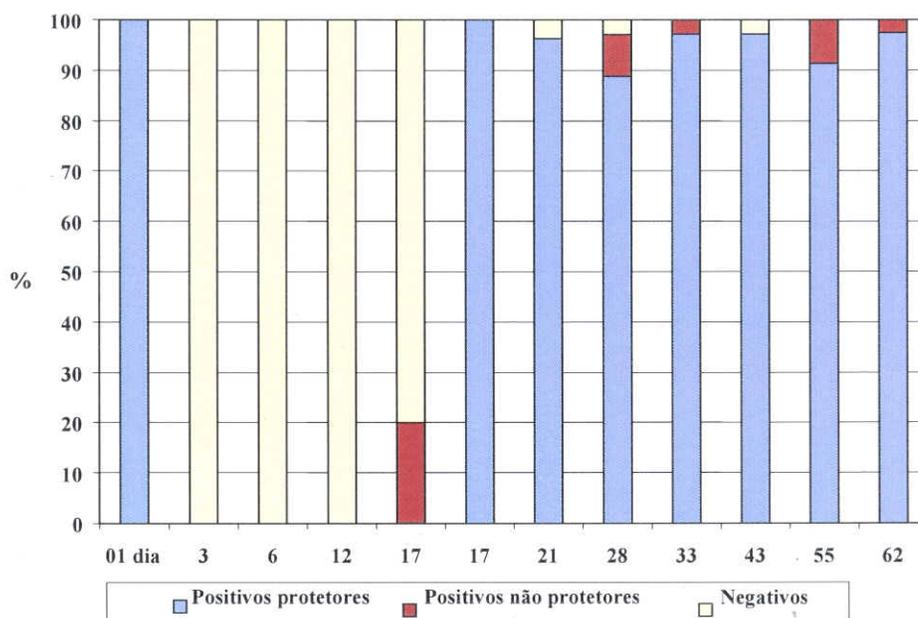


Figura 6. Taxa de animais soropositivos em ELISA para o vírus da anemia infecciosa das galinhas de lotes de matrizes pesadas em diferentes idades, com percentual de anticorpos considerados protetivos dentre esses positivos.

Esses resultados demonstram claramente a realidade de campo, na qual os lotes podem variar entre si quanto a soroconversão ao VAIG, dependendo de diferentes fatores, tais como biossegurança, manejo, tempo de produção de matrizes no local ou sinergismo do vírus com outros agentes imunossupressores, como micotoxinas e infecções virais.

Como visto anteriormente, a AIG se manifesta apenas em aves infectadas nas primeiras semanas de vida, enquanto aves adultas, apesar de susceptíveis à infecção soroconvertem, mas não desenvolvem a doença clínica, indicando que o controle da AIG é baseado na transferência de imunidade passiva das matrizes à progênie e controle no rigor do programa de biosseguridade adotado,

Segundo os dados obtidos, após a queda dos anticorpos passivos, que ocorreu entre uma e três semanas, as aves se tornaram susceptíveis ao vírus, e ao aparecimento da doença clínica, já que essa idade é considerada crítica. Porém, nunca foi observado nenhum indício de problemas relacionados com a infecção pelo VAIG nas matrizes com essa idade, o que pode ser explicado pela falta de desafio viral que é comprovado pela presença de 100% de animais soronegativos de três a 12 semanas. Isto mostra a existência de uma boa biosegurança adotada na granja de matrizes, contrastando com as observações de Cardona, 2003, onde em granjas de frangos, onde os níveis de anticorpos maternos caem totalmente com quatro semanas e o lote volta a soroconverter com cinco semanas, apresentando 100% de soropositivos já com seis semanas de idade.

Apesar de não podermos precisar qual foi o período exato em que as aves entraram em contato com o vírus, qual foi a fonte de infecção, e nem se o vírus já circulava na granja ou foi introduzido de fonte externa, é provável que os lotes tenham ficado soronegativos durante grande período na recria devido a uma melhora significativa nos procedimentos a biosegurança da granja, pois em análises feitas há aproximadamente três anos atrás por laboratório terceirizado, lotes com oito semanas de idade nessa granja se mostraram soropositivos.

Algumas reflexões sobre a origem e circulação do vírus na granja foram realizadas durante este estudo. O fato de que 100% das matrizes com um dia têm níveis de anticorpos protetores e que após a queda dos anticorpos passivos os lotes só soroconvertem por volta de 17 semanas de idade indica que seria pouco provável que o vírus tenha vindo da origem, através de transmissão vertical.

Os circovírus são altamente resistentes às condições ambientais. Os galpões de recria são ocupados por lotes de matrizes que entram com um dia e são transferidos para os galpões de reprodução com 21 semanas

de idade. Estas aves se infectam, eliminam o vírus nestes galpões e soroconvertem neste intervalo, como comprovado na Figura 3. O fato de que as aves, após a queda dos anticorpos passivos permanecem nove semanas sem soroconversão, indica que há um bom controle ambiental do vírus através de adequada limpeza e desinfecção dos galpões, entre a saída de um lote de aves adultas e a entrada de um novo lote com aves jovens.

Porém pensou-se também na possibilidade de que pequenas quantidades de partículas virais tenham permanecido no ambiente, e as medidas de manejo adotadas na fase entre 12 e 15 semanas estariam possibilitando a disseminação do vírus que poderia ter infectado algumas aves do plantel, e se disseminando para o restante das aves do galpão.

Um das práticas de manejo realizadas nessa fase, onde há redistribuição de aves entre os galpões, é a seleção 100%. Entre a 13ª e a 15ª semanas de idade, é feita uma seleção 100% nos lotes, que consiste em separar os animais por categoria de peso, entre leves, médios e pesados, e redistribuí-los dentro da faixa de peso determinada entre os diferentes compartimentos chamados de "boxes" dentro do galpão.

Vacinações múltiplas e outros fatores estressantes também são realizadas entre 12 e 15 semanas e envolvem grande movimentação de animais, pessoas e equipamentos dentro do lote.

Não podemos descartar também a possibilidade do vírus ser introduzido no plantel na ocasião destas práticas ou de outras que não conseguimos identificar, tais como pessoal, mudança de níveis nutricionais e volumes de ração e outros fatores estressantes considerados cruciais nesse processo de disseminação viral.

A Figura 7 mostra as variações máxima, mínima e a média com o desvio padrão nos níveis de anticorpos das amostras testadas em cada lote.

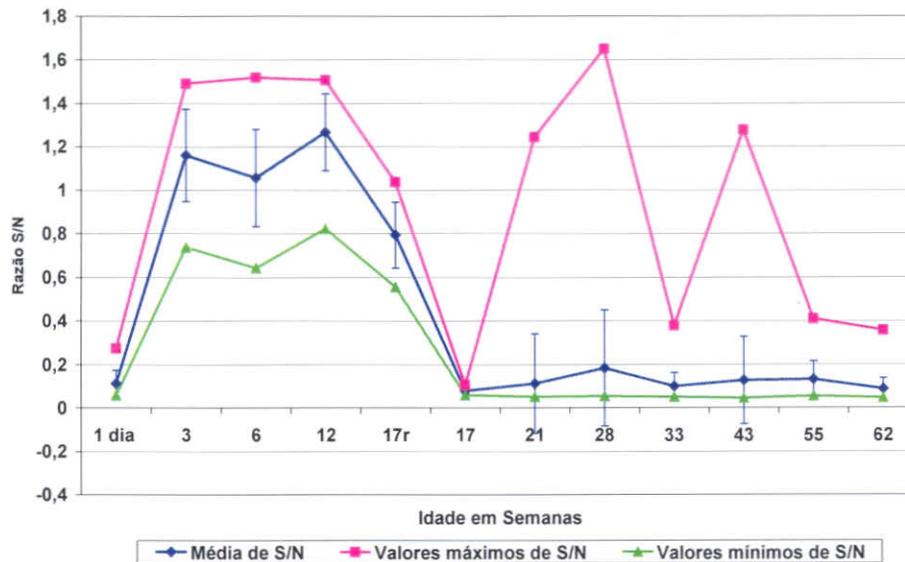


Figura 7. Valores médios, máximo, mínimo e desvio padrão da razão S/N no teste ELISA para lotes de matrizes pesadas em diferentes fases do ciclo produtivo.

Observou-se que a diferença dos valores máximo e mínimo, assim como o desvio-padrão foi muito pequeno no lote de um dia, indicando uniformidade nos níveis de anticorpos. Isto ocorreu provavelmente pelo fato de 100% dos animais testados serem provenientes de avós vacinadas num mesmo momento. Observamos também que nas idades de recria, à medida que estas aves começam a soroconverter, essa variação em torno da média é maior, pois aumenta o número de aves com diferentes níveis de anticorpos que, apesar de serem considerados negativos dentro do ponto de corte do "Kit", já apresentam valores mais próximos da positividade.

Observamos também que existe uma variação nos níveis de anticorpos protetores nos animais dentro do lote, com variações grandes, indicando que existem animais com razão S/N muito próxima do ponto de corte.

5.2. Reação de Polimerase em Cadeia-PCR

A utilização da técnica de PCR para diagnóstico do VAIG teve como objetivo a detecção de DNA do VAIG em "pools" de órgãos de embriões com 20 dias de incubação, proveniente de matrizes previamente testadas sorologicamente para VAIG, através da utilização de inicializadores específicos a seqüências de DNA já conhecidas do genoma de amostras padrão do VAIG. Os resultados de PCR apresentam alta correlação com resultados de isolamento viral *in vivo*, validando o PCR como um método específico de diagnóstico, com a vantagem de obtermos o diagnóstico rápido, em um a três dias, em contraste com duas a três semanas necessárias nos métodos de isolamento viral. (Brentano et al., 2000).

Segundo resultado das análises feitas pelo laboratório Simbios Biotecnologia, todas as amostras testadas foram negativas para a detecção do DNA do vírus nos embriões provenientes das aves estudadas.

As Figuras 8 e 9 mostram os resultados obtidos da análise dos embriões.

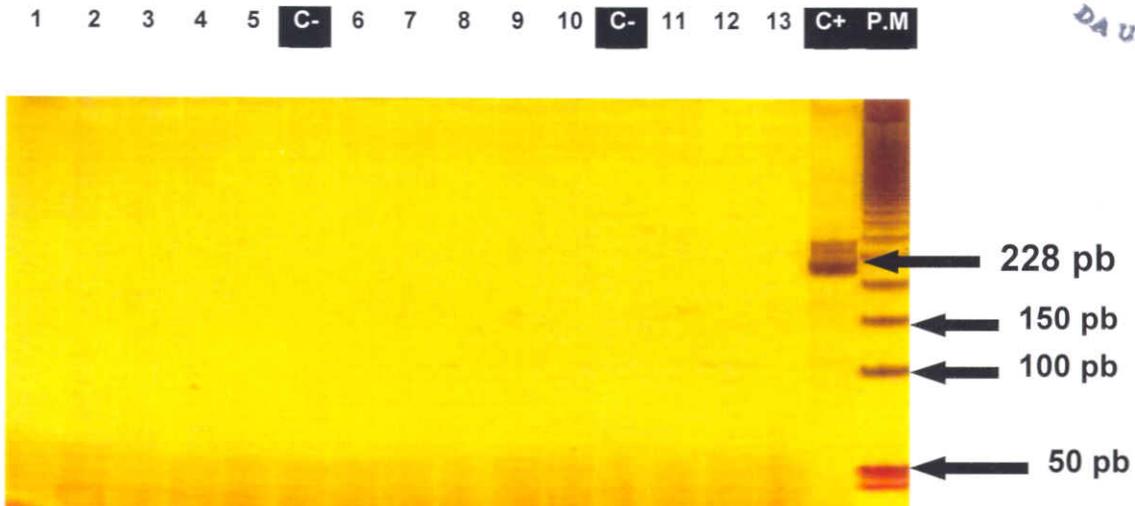


Figura 8. Eletroforese dos produtos de PCR de embriões em gel de poliacrilamida 10% corado com nitrato de prata. Canaletas 1 a 5: lote J ; canaletas 6 a 10: lote I; canaletas 11 a 13 lote H. A posição da banda de 228 bp do controle positivo é demonstrada pela seta. PM: peso molecular ("50 bp ladder" - Pharmacia); C+: controle positivo; C-: controle negativo.

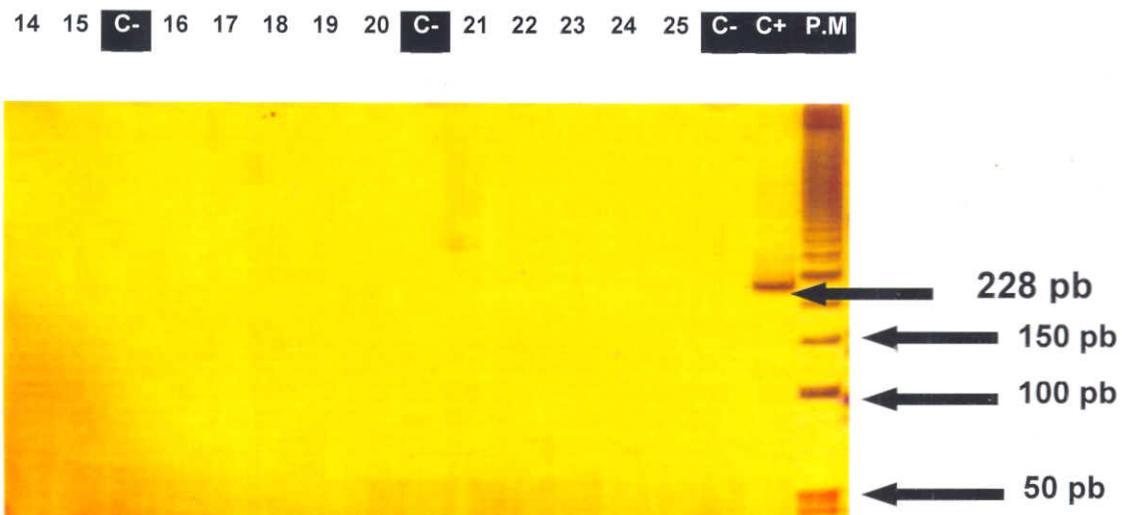


Figura 9. Eletroforese dos produtos de PCR em gel de poliacrilamida. Canaletas 14 a 15: lote H; canaletas 16 a 20: lote G; canaletas 21 a 25: lote F. A posição da banda de 228 bp do controle positivo é demonstrada pela seta. PM: peso molecular ("50 bp ladder" - Pharmacia); C+: controle positivo; C-: controle negativo.

- GORYO, M.; SUGIMURA, H.; MATSUMOTO, S. et al. Isolation of an agent inducing chicken anaemia. *Avian Pathology*, v.14, n.3, p.483-496, 1985.
- HAGOOD, L. T.; KELLY, T. F.; WRIGHT, J. C.; HOERR, F. J. Evaluation of chicken infectious anemia virus and associated risk factors with disease and production losses in broilers. *Avian Disease*, v.44, n.4, p.803-808, 2000.
- HOOP, R. K. Persistence and vertical transmission of chicken anaemia agent in experimentally infected laying hens. *Avian Pathology*, v.21, n.3, p.493-501, 1992.
- HOOP, R.K.; REECE, R.L. The use of immunofluorescence and immunoperoxidase staining in studying the pathogenesis of chicken anaemia agent in experimentally infected chickens. *Avian Pathology*, v.20, n.2, p.349-355, 1991.
- HOOP, R. K. Transmission of chicken anaemia virus with semen. *Veterinary Record*, v.133, n.22, p.551-552, 1993.
- IKUTA, N. Diagnóstico molecular de patologias infecciosas aviárias. In: SIMPÓSIO DE SANIDADE AVÍCOLA, 2., 2000, Santa Maria. *Anais... Concórdia: EMBRAPA SUÍNOS E AVES*, 2000. p.30-38.
- JEURISSEN, S. H. M.; BOONSTRA-BLOM, A. G. et al. Defence mechanisms against viral infection in poultry: a review. *Veterinary Quarterly*, v.22, n.4, p.204-208, 2000.
- JORGENSEN, P. H. Mortality during an outbreak of blue wing disease in broilers. *Veterinary Research*, v.129, p.490-491, 1991.
- LAMICHHANE, C. M.; SNYDER, D. B.; GOODWIN, M. A. et al. Pathogenicity of CL-1 chicken anemia agent. *Avian Diseases*, v.35, n.3, p.515-522, 1991.
- LUCIO, B.; SCHAT, K. A.; SHIVAPRASAD, H. L. Identification of the chicken anemia agent, reproduction of the disease, and serological survey in the United States. *Avian Diseases*, v.34, n.1, p.146-153, 1990.
- MARKOWSKI-GRIMSRUD, C. J.; MILLER, M. M.; SCHAT, K. A. Development of strain-specific real-time PCR and RT-PCR assays for quantification of chicken anemia virus. *Journal of Virological Methods*, v.101, n.1-2, p.135-147, 2002.
- McCONNELL, C. D. G.; ADAIR, B. M.; McNULTY, M. S. Effects of chicken anemia virus on macrophage function in chickens. *Avian Diseases*, v.37, n.2, p.358-365, 1993a.
- McCONNELL, C. D. G.; ADAIR, B. M.; McNULTY, M. S.; Effects of chicken anemia virus on cell mediated immune function in chickens exposed to the virus by a natural route. *Avian Diseases*, v.37, n.2, p.366-372, 1993b.
- McILROY, S. G.; McNULTY, M. S.; BRUCE, D. W. et al. Economic effects of clinical anemia agent infection on profitable broiler production. *Avian Diseases*, v.36, n.3, p.566-574, 1992.
- McNAMEE, P.; McCULLAGH, J. D.; RODGERS, J. D. et al. Development of an experimental model of bacterial chondronecrosis with osteomyelitis in broilers following exposure to *Staphylococcus aureus* by aerosol, and inoculation with chicken anaemia and infectious bursal disease viruses. *Avian Pathology*, v.28, n.1, p.26-35, 1999.
- McNEILLY, F.; ALLAN, G.M.; MOFFET, D.A.; McNULTY, M.S. Detection of chicken anaemia agent in chickens by immunofluorescence and immunoperoxidase staining. *Avian Pathology*, v.20, n.1, p.125-132, 1991.
- McNEILLY, F.; SMYTH, J. A.; ADAIR, B. M. McNULTY, M. S. Synergism between chicken anemia virus (VAIG) and avian reovirus following dual infection of 1-day-old chicks by a natural route. *Avian Diseases*, v.39, n.3, p.532-537, 1995.

- McNULTY, M. S.; CONNOR, T. J.; McNEILLY, F. et al. A serological survey of domestic poultry in the United Kingdom for antibody to chicken anemia agent. *Avian Pathology*, v.17, n.1, p.315-324, 1988.
- McNULTY, M. S.; CONNOR, T. J.; McNEILLY, F.; SPACKMAN, D. Chicken anemia agent in the United States: Isolation of the virus and detection of antibody in broiler breeder flocks. *Avian Diseases*, v.33, n.4, p.691-694, 1989a.
- McNULTY, M. S.; CONNOR, T. J.; McNEILLY, F. A survey of specific pathogen-free flocks for antibodies to chicken anemia agent. *Avian Pathology*, v. 18, n.2, p.215-220, 1989b.
- McNULTY, M.S.; CONNOR, T.J.; McNEILLY, F. Influence of virus dose on experimental anemia due to chicken anemia agent. *Avian Pathology*, v. 19, n.1, p.167-171, 1990.
- McNULTY, M. S.; McILROY, S. G.; BRUCE, D. W.; TODD, D. Economic effects of subclinical chicken anemia agent infection in broiler chickens. *Avian Diseases*, v.35, n.2, p.263-268, 1991a.
- McNULTY, M. S. Chicken anaemia agent: a review. *Avian Pathology*, v.20, n.2, p.187-203, 1991b.
- McNULTY, M. S. Chicken anaemia virus: a glimpse of the future? *British Poultry Science*, v.38, n.1, p.7-13, 1997.
- MENDES, A. A.; PATRICIO, I. S. Controle, registros e avaliação do desempenho de frangos de corte. In: MENDES, A. A.; NAAS, I. A.; MACARI, M. (Eds). *Produção de frangos de corte*. Campinas: FACTA, 2004. p.323-335.
- MIERS, L.A.; BANKOWSKI, R.A.; ZEE, Y.C. Optimizing the enzyme-linked immunosorbent assay for evaluating immunity of chickens to Newcastle disease. *Avian Diseases*, v.27, n.4, p.1112-1125, 1994.
- MILLER, M. M.; EALEY, K. A.; OSWALD, W. B.; SCHAT, K. A. Detection of chicken anemia virus DNA in embryonal tissues and eggshell membranes. *Avian Diseases*, v.47, n.3, p.662-671, 2003.
- MONTASSIER, H. J.; Enfermidades do sistema imune. In:BERCHIERI JUNIOR, A.; MACARI, M. (Eds). *Doenças das aves*. Campinas: FACTA, 2000. p.133-150.
- OTAKI, Y.; NUNOYA, T.; TAJIMA, M. et al. Depression of vaccinal immunity to Marek's disease by infection with chicken anemia agent. *Avian Pathology*, v.17, n.2, p.333-347, 1988.
- OTAKI, Y.; SAITO, M.; TAJIMA, M.; NOMURA, Y. Persistence of maternal antibody to chicken anaemia agent and its effect on the susceptibility of young chickens. *Avian Pathology*, v.21, n.1, p.147-151, 1992.
- OWOADE, A. A.; OLUWAYELU, O. A.; FAGBOHUN, W. A. et al. Serologic evidence of chicken infectious anemia in commercial chicken flocks in Southwest Nigeria. *Avian Diseases*, v.48, n.1, p.202-205, 2004.
- POPE, C. R. Chicken anemia agent. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.30, n.1, p.51-65, 1991.
- POWELL, P. C. Immune mechanisms in diseases of poultry. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.15, n.1/2, p.87-113, 1987.
- ROSALES, A. G. Monitoria sorológica em aves. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 1999, Campinas. *Anais ...* Campinas: FACTA, 1999. p.47-51.
- ROSENBERGER, J. K., CLOUD, S. S. The isolation and characterization of chicken anemia agent (CAA) from broilers in the United States. *Avian Diseases*, v.33, n.4, p.707-713, 1989a.
- ROSENBERGER, J. K., CLOUD, S. S. The effects of age, route of exposure, and

coinfection with infectious bursal disease virus on the pathogenicity and transmissibility of chicken anemia agent (CAA). *Avian Diseases*, v.33, n.4, p.753-759, 1989b.

SANTOS, C. H. C.; SILVA, E. N. Métodos de diagnósticos laboratoriais microbiológicos e sorológicos. In: BERCHIERI JUNIOR, A.; MACARI, M. (Eds.). *Doenças das aves*. Campinas: FACTA, 2000. p.171-182.

SCHAT, K. A. A patogenia do vírus da anemia infecciosa das galinhas, a relação hospedeiro-vírus definitiva. In: *CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLA*, 2004. Santos. *Anais...* Campinas: FACTA, 2004. p183-190.

SMYTH, J.A.; MOFFET, D.A.; McNULTY, M.S. et al. A sequential histopathologic and immunocytochemical study of anemia infection at one day of age. *Avian Diseases*, v.37, n.2, p.324-338, 1993.

SOINÉ, C.; LUCIO, B.; SCHAT, K. A.; Determination of the detection limit of the polymerase chain reaction for chicken infectious anemia virus. *Avian Diseases*, v.37, n.2, p.467-476, 1993.

THAM, K. M.; STANISLAWEK, W. L. Polymerase chain reaction amplification for direct detection of chicken anemia virus DNA in tissues and sera. *Avian Diseases*, v.36, n.4, p.1000-1006, 1992.

TODD, D. Circoviruses: immunosuppressive threats to avian species: a review. *Avian Pathology*, v.29, n.5, p.373-394, 2000.

TODD, D.; MAWHINNEY, D. A.; McNULTY, M. S. Detection of chicken anemia virus isolates by using the polymerase chain reaction. *Journal of clinical Microbiology*, v.30, n.7, p.1661-1666, 1992.

VIELITZ, E.; LANDGRAF, H. Anaemia-deramtitis of broilers: field observations on

its occurrence, transmission and prevention. *Avian Pathology*, v.17, n.1, p.113-120, 1988.

YUASA, N.; TANIGUCHI, T.; YOSHIDA, I. Isolation and some characteristics of an agent inducing anemia in chicks. *Avian Diseases*, v.23, n.2, p.366-385, 1979a.

YUASA, N.; TANIGUCHI, T.; NOGUCHI, T.; YOSHIDA, I. Effect of Infectious bursal disease virus infection on incidence of anemia by chicken anemia agent. *Avian Diseases*, v.24, n.1, p.202-209, 1979b.

YUASA, N.; NOGUCHI, T.; FURUTA, K.; YOSHIDA, I. Maternal antibody and its effect on susceptibility of chicks to chicken anemia agent. *Avian Diseases*, v.24, n.1, p.197-201, 1980.

YUASA, N.; TEZUKA, H. Survey of antibodies against chicken anemia agent (CAA) by an immunofluorescent antibody technique in breeder flocks in Japan. *Avian Pathology*, v.14, p.521-530, 1985.

YUASA, N. Propagation and infectivity titration of the Gifu-1 strain of chicken anemia agent in a cell line (MDCC-MSB1) derived from Marek's disease lymphoma. *National Institute Animal Health Quarterly*, v.23, n.1, p. 13-20, 1983a.

YUASA, N.; TANIGUCHI, T.; IMADA, T.; HIHARA, H. Distribution of chicken anemia agent (CAA) and detection of neutralizing antibody in chicks experimentally inoculated with CAA. *National Institute Animal Health Quarterly*, v.23, p. 78-81, 1983b.

YUASA, N.; YOSHIDA, I. Experimental egg transmission of chicken anemia agent. *National Institute Animal Health Quarterly*, v.23, n.3, p. 99-100, 1983c.

YUASA, N.; IMAI, K. Pathogenicity and antigenicity of eleven isolates of chicken anaemia agent. *Avian Pathology*, v.15, n.4, p.639-645, 1986.