

**INGRED SALES PREIS**

**Achados patológicos e aspectos moleculares do vírus da  
laringotraqueíte infecciosa em um surto em galinhas no sul de  
Minas Gerais**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Ciência Animal da Universidade Federal de Minas  
Gerais, como parte dos requisitos para a obtenção do  
grau de Mestre em Patologia Animal.

**Área de Concentração:** Patologia Animal

**Orientadora:** Prof<sup>ª</sup> Dra. Roselene Ecco

**Belo Horizonte  
Escola de Veterinária - UFMG  
2013**

P924a Preis, Ingrid Sales, 1986-  
Achados patológicos e aspectos moleculares do vírus da laringotraqueíte infecciosa em um surto em galinhas no sul de Minas Gerais/ Ingrid Sales Preis. – 2013.  
64 p. : il

Orientador: Roselene Ecco

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

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

CDD – 636.508 966

Dissertação defendida e aprovada em 28 de Fevereiro de 2013, pela Comissão Examinadora constituída por:

*Roselene Ecco*

---

Profa. Roselene Ecco

Presidente

*David Driemeier*

---

Prof. David Driemeier

*Nelson*

---

Prof. Nelson Rodrigo da Silva Martins



## AGRADECIMENTOS

Primeiramente ao meu Senhor e Salvador Jesus Cristo pela vida e amor incondicional.

Ao meu pai Brenno pelo apoio, por sempre demonstrar confiança em mim. Sem ele, eu não teria condições de avançar em mais um etapa da minha vida acadêmica.

Agradeço também à minha mãe pelo seu carinho, sua amizade e também por acreditar em mim. Um especial agradecimento também aos meus irmãos Brenno e Natasha, à minha tia Sandra, minha vó Ligia e minha querida Ua. Aos meus amigos pelo apoio e ao meu querido Thiago pelo amor e companheirismo.

Agradeço imensamente a minha professora Roselene Ecco. Muito obrigada pela confiança, pela paciência, pelo apoio em momentos difíceis em minha vida. Você é e sempre será um grande exemplo pra mim como pessoa e como profissional.

Aos amigos da Patologia que proporcionaram um ambiente agradável e uma convivência prazerosa. Aos queridos: Leimar, Michelle Gabardo, Lorena, Júnio, Silvia, Luciana, Ana Patrícia, Marina Rios, Amanda Gabriele, Eliana, Auricélio, Amanda, Érica Costa, Carlos, Andreia, Aninha.

À minha querida amiga Juliana Fortes, pela sua amizade e grande apoio em todos os momentos.

Aos meus colegas Rodrigo Macedo e Isabela Avelar pelo companheirismo e ajuda.

À Tatiane Fiúza, aluna de Iniciação Científica, pela sua grande ajuda nos testes de imunohistoquímica. Obrigada pelo apoio e amizade.

Aos professores do Setor de Patologia: Ernane Fagundes, Roberto Guedes, Rogéria Serakides e Natália Ocarino pelos ricos ensinamentos durante todo o curso.

Ao professor Nelson Martins por ceder o Laboratório de Doença das Aves para realização de extração de DNA, pelos ensinamentos e pela gentileza.

Ao professor Maurício Resende pela colaboração.

Ao Bruno Brasil por compartilhar seus conhecimentos, pela cortesia e paciência.

Aos veterinários do IMA, Altino Rodrigues Neto, Sergio L. L. Monteiro, Izabella Hergot, Luiz A. Torino, Simone G. Palma, Renata G. P. Tomich, que contribuíram grandemente para a realização deste trabalho, sempre com gentileza e interesse.

---

## SUMÁRIO

---

<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	7
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	7
<b>LISTA DE ANEXOS</b> .....	9
<b>RESUMO</b> .....	11
<b>ABSTRACT</b> .....	13
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	15
2.1 Histórico .....	16
2.2 Etiologia .....	16
2.3 Epidemiologia .....	16
2.4 Patogenia .....	16
2.5 Sinais clínicos .....	17
2.6 Macroscopia .....	17
2.7 Lesões histológicas .....	17
2.8 Diagnóstico .....	17
2.9 Controle .....	18
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	18
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	18
4.1 Localização .....	18
4.2 Histórico .....	21
4.3 Aves .....	21
4.4 Coleta de material .....	21
4.5 Histopatologia .....	22
4.6 Amostras de swab ou suabe .....	22
4.7 Imuno-histoquímica .....	22
4.8 Extração de DNA .....	22
4.9 Reação em cadeia pela polimerase (PCR) .....	23
4.10 Sequenciamento de DNA .....	25

<b>5. RESULTADOS</b> .....	25
5.1 Epidemiologia .....	25
5.2 Sinais clínicos .....	25
5.2 Lesões macroscópicas .....	26
5.3 Histopatologia .....	26
5.4 Diagnóstico diferencial .....	29
5.5 Imuno-histoquímica .....	29
5.6 Reação em cadeia pela polimerase (PCR) .....	29
5.7 Sequenciamento .....	30
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	37
<b>7. CONCLUSÕES</b> .....	41
<b>8. REFERÊNCIAS</b> .....	43

---

#### LISTA DE TABELAS

---

<b>Tabela 1.</b> Número de aves cujas amostras foram fixadas em formol e embebidas em parafina analisadas pelas técnicas de histopatologia, IHQ e PCR.....	24
<b>Tabela 2.</b> Porcentagem de tecidos positivos para LTI na histopatologia, imunoistoquímica e PCR.....	30
<b>Tabela 3</b> – Comparação entre a estirpe ILTV Brasil/2011/UFMG e outras estirpes depositadas no GenBank .....	30
<b>Tabela 4.</b> Alinhamento da sequência de nucleotídeos de ILTV Brasil/2011/UFMG com as sequências EU104910.1; ILTV JN596963.1; ILTV JN580316.1; JN580315.1 .....	31
<b>Tabela 5.</b> Alinhamento da sequência de aminoácidos de ILTV Brasil/2011/UFMG com as sequências EU104910.1; ILTV JN596963.1; ILTV JN580316.1; JN580315.1 .....	32

---

#### LISTA DE FIGURAS

---

<b>Figura 1.</b> Mapa da região das terras altas da Mantiqueira. Em destaque os municípios Pouso Alto, Itanhandu, Itamonte e Passa Quatro .....	19
---	----

<b>Figura 2.</b> Mapa das cidade de Minas Gerais onde foram coletadas amostras de aves de postura. A- Rio Pomba; B- Prados; C- Itabira; D- Pará de Minas; E- Curvelo.....	<b>20</b>
<b>Figura 3.</b> Proporções de tecidos com lesões de LTI nas aves de postura comercial .....	<b>26</b>
<b>Figura 4.</b> Proporções das lesões histológicas sugestivas de outros patógenos respiratórios nas galinhas de postura comercial .....	<b>28</b>
<b>Figura 5.</b> Ave de postura. Observa-se a ave com dificuldade respiratória mantendo o bico aberto devido a acúmulo de exsudato na entrada da traqueia.....	<b>35</b>
<b>Figura 6.</b> Ave de postura. Observa-se na laringe acúmulo de um material branco-amarelado ocluindo a entrada da traqueia.....	<b>35</b>
<b>Figura 7.</b> Laringe e traqueia seccionada longitudinalmente. Observa-se acúmulo de material branco-amarelado depositado sobre a mucosa moderadamente hiperêmica. Laringite e traqueíte fibrino-necrótica aguda intensa.....	<b>35</b>
<b>Figura 8.</b> Fotomicrografia de traqueia. Observa-se espessamento difuso e acentuado da mucosa devido a infiltrado linfoplasmocitário. Observa-se também formação de sincícios e desprendimento das células epiteliais de revestimento para o lúmen. 20X. HE. ....	<b>35</b>
<b>Figura 9.</b> Fotomicrografia de traqueia. Observam-se no lúmen da traqueia restos de células inflamatórias, hemácias e vários sincícios com e sem corpúsculos de inclusão intranucleares. ....	<b>40X. HE.....35</b>
<b>Figura 10.</b> Fotomicrografia de concha nasal. Observa-se infiltrado linfoplasmocitário difuso e formando agregados na lâmina própria associado a necrose e desprendimento do epitélio de revestimento para o lúmen. 10X. HE.....	<b>35</b>
<b>Figura 11.</b> Fotomicrografia de traqueia. Observa-se que a mucosa se desprendeu quase completamente e a lâmina própria se encontra exposta. Observa-se também detalhe das células sinciciais formadas a partir de fusão de várias células epiteliais. Os núcleos possuem corpúsculos de inclusão eosinofílicos com um “halo” claro ao redor,	



denominados	corpúsculos	Cowdry	tipo	A.	60X.
HE.....					<b>36</b>
<b>Figura 12.</b> Fotomicrografia de conjuntiva. Observa-se hiperplasia intensa da mucosa associado a infiltrado linfoplasmocitário e formação e desprendimento de células sinciciais.					
HE.....					<b>36</b>
<b>Figura 13.</b> Fotomicrografia de traqueia. Observa-se espessamento intenso da mucosa devido a infiltrado linfoplasmocitário na lâmina própria e hiperplasia do epitélio de revestimento. No citoplasma de várias células epiteliais (setas vermelhas), observam-se corpúsculos de inclusão eosinofílicos compatíveis com Bouda aviária e também formação de células sinciciais com corpúsculos de inclusão intranucleares.					
HE.....					<b>36</b>
<b>Figura 14.</b> Fotomicrografia de traqueia. Observar marcação marrom-amarelada granular no citoplasma das células sinciciais.					
60X. IHQ.....					<b>36</b>
<b>Figura 15.</b> Fotomicrografia de pulmão. Observar células sinciciais com marcação marrom-amarelada granular no citoplasma.					
40X. IHQ.....					<b>36</b>
<b>Figura 16.</b> Fotomicrografia de pulmão. Observar marcação marrom-amarelada granular no citoplasma de células epiteliais descamadas.					
60X. IHQ .....					<b>36</b>

---

## LISTA DE ANEXOS

---

<b>Anexo 1.</b> Distribuição do vírus da LTI na conjuntiva e nos tecidos respiratórios identificados pela IHQ e PCR .....	<b>47</b>
<b>Anexo 2.</b> Lesões histológicas observadas nos tecidos respiratórios e na conjuntiva das aves de postura comercial .....	<b>50</b>
<b>Anexo 3.</b> Questionário epidemiológico para aves de postura .....	<b>62</b>
<b>Anexo 4.</b> Protocolo nº 204/2011 do Comitê de Ética em Experimentação Animal.....	<b>64</b>



## Resumo

A laringotraqueíte infecciosa (LTI) é uma doença do aparelho respiratório de galinhas que possui distribuição mundial sendo responsável por grandes perdas econômicas. Em novembro de 2010, o Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) notificou pela primeira vez ao MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) uma suspeita da doença no sul do Estado de Minas Gerais que posteriormente foi confirmada nos municípios Itanhandu, Pouso Alto, Passa Quatro, Itamonte e Pedralva, pertencentes às Terras Altas da Mantiqueira. Alguns dados epidemiológicos foram coletados e realizadas necropsias de aves com sinais clínicos respiratórios e coletadas amostras de laringe, traqueia, pulmão, conjuntiva, conchas e seios nasais, gânglio trigêmio e encéfalo de 78 galinhas de granjas de postura comercial da região onde ocorreu o surto. Amostras dos mesmos tecidos de 12 galinhas de subsistência e suabes laringotraqueais de outras 21 galinhas dessa região também foram coletadas. Além disso, foram coletadas amostras de tecidos de 18 galinhas de outras regiões do Estado de Minas Gerais. A imuno-histoquímica foi realizada em tecidos de 30 das 78 aves de postura comercial utilizando um anticorpo monoclonal específico para a glicoproteína gJ do envelope viral. Para a extração de DNA, foram utilizados tecidos fixados em formol e embebidos em parafina das 78 galinhas de postura comercial, de 8/12 galinhas de subsistência, 10/18 galinhas de outras regiões do Estado de MG e também das amostras de suabes laringo-traqueais. A reação em cadeia pela polimerase (PCR) foi realizada utilizando *primers* que amplificam um produto de 237 pares de base correspondentes a uma região diplóide invertida do gene ICP4. Duas amostras fixadas e duas de suabe foram encaminhadas para sequenciamento e alinhadas a outras cepas depositadas no *GenBank*. Os sinais clínicos caracterizaram-se por dificuldade respiratória, tosse, espirros, secreção nasal, por vezes sanguinolenta, apatia e em algumas aves, aumento de volume dos seios paranasais e da conjuntiva. A mortalidade observada variou de 1% a 6% entre as diferentes granjas. À necropsia, algumas aves apresentaram laringite e traqueíte fibrinosa aguda difusa moderada; outras apresentaram laringite e traqueíte fibrino-necrótica (diftérica) aguda moderada além de formação e acúmulo de material necrótico amarelado obstruindo a laringe. Foram observadas também lesões fibrinonecroticas nos seios nasais e conjuntiva. Na histopatologia, observou-se lesão característica de LTI em 25/78 (32%) laringes e traqueias, caracterizadas por hiperplasia e descamação do epitélio e fusão de células epiteliais formando sincícios contendo corpúsculo de inclusão intranuclear. Em 15/78 (19%) aves observaram-se células sinciciais com corpúsculo de inclusão intranuclear nos seios paranasais e, na conjuntiva de 24/78 (30%) aves, essas células também foram observadas. Nos pulmões, observou-se lesão característica de LTI em 21/78 (26%) aves. Na imuno-histoquímica, detectou-se marcação positiva no citoplasma de sincícios com corpúsculo de inclusão e também em algumas células aparentemente normais nos quatro tecidos testados- laringe/traqueia, conjuntiva, pulmão e seios paranasais. Observou-se maior sensibilidade da PCR no diagnóstico de LTI quando comparado à histopatologia. As estirpes enviadas para sequenciamento tiveram 100% de identidade com uma estirpe dos Estados Unidos (EU104910.1); 99% com uma da Austrália (JN596963.1) e 91% com estirpes vacinais CEO (JN580316.1) e TCO (JN580315.1). O tecido onde se observou maior incidência de lesões características de LTI foi a laringe/traqueia; porém, além de lesões na traqueia, observou-se também em várias aves lesões nos pulmões, seguidos pelos seios nasais e conjuntiva. A validação da PCR em material fixado em formol e embebido em parafina oferece a vantagem de permitir o teste em tecidos fixados por formol, que viabiliza estudos retrospectivos e alternativa de conservação onde não há congelamento adequado. O alinhamento da sequência LTI BRASIL/2011/UFMG (KC182579) mostrou algumas diferenças em nível de nucleotídeos que determinaram também diferenças em nível de aminoácidos (mutações) quando

comparada às sequências das estirpes vacinais TCO e CEO. Porém, sequenciamentos futuros de regiões maiores do gene ICP4 devem ser feitos para determinar se há correlação entre a estirpe envolvida no surto de LTI no sul de MG e outras estirpes selvagens e vacinais.

**Palavras chaves:** laringotraqueíte infecciosa, herpesvirus, galinhas de postura, histopatologia, imuno-histoquímica, PCR.

## Abstract

Infectious laryngotracheitis (ILT) is a respiratory disease of chickens that has worldwide distribution resulting in severe economic losses. In November 2010, the Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) notified the MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) a suspicion of the disease in the southern state of Minas Gerais, which later was confirmed. The municipalities involved, included Itanhandu, Pouso Alto, Passa Quatro, Itamonte and Pedralva, belonging to the Highlands of Mantiqueira. Some epidemiological data were collected, necropsies of birds with respiratory clinical signs were performed and samples from larynx, trachea, lung, conjunctiva, turbinates and sinuses, trigeminal ganglia and brain of 78 chickens from laying hens farms in the area where the outbreak occurred were collected. Samples from the same tissues from 12 backyard chickens and laryngotracheal swabs from other 21 commercial chickens of this region were also collected. Additionally, tissue samples were collected from 18 chickens in other regions of the Minas Gerais state. Immunohistochemistry on 30 out of 78 tissues from commercial laying hens was performed using a monoclonal antibody specific for the protein gJ. For DNA extraction, formalin fixed and paraffin embedded (FFPE) tissues from 78 commercial laying hens, eight backyard chickens and chickens from other regions of Minas Gerais state were used. Also, laryngotracheal swabs were made and used for DNA extraction. Later, polymerase chain reactions (PCR) were made using primers that amplify a product of 237 base pairs corresponding to a region of reversed diploid gene ICP4. Two FFPE and two swabs samples were sent for sequencing and aligned to other strains deposited in GenBank. Clinical signs were characterized by difficulty breathing, coughing, sneezing, nasal discharge, sometimes bloody, apathy and in some birds, swelling of the sinuses and conjunctiva. Mortality varied from 1% to 6% between different farms. At necropsy, some chickens had diffuse moderate acute fibrinous laryngitis and tracheitis; others had acute laryngitis and tracheitis fibrino-necrotic (diphtheric membrane) or formation and accumulation of yellowish necrotic material obstructing the larynx. Fibrinonecrotic lesions were also observed in the sinuses and conjunctiva. Histopathology revealed lesions characteristic of ILT in 25/78 (32%) larynx and trachea, characterized by hyperplasia and desquamation of the epithelium and fusion of epithelial cells forming syncytia containing intranuclear inclusion body. In 15/78 (19%) birds were observed syncytial cells with intranuclear inclusion body in the paranasal sinuses, and in 24/78 (30%) birds these cells were also observed in the conjunctiva. In the lung, 21/78 (26%) birds had ILT characteristic lesions. In the immunohistochemistry, positive marker was detected in the cytoplasm of syncytia cells, which inclusion body cells were visualized and also in some no syncytial cells of the four tested tissues. For PCR test, we observed a higher sensitivity for the diagnosis of ILT compared to histopathology. Samples sent for sequencing had 100% identity with United States (EU104910.1) strain, 99% with Australia (JN596963.1) strain and 91% with vaccine strains CEO (JN580316.1) and TCO (JN580315.1) strains. The tissue with more incidences of ILT characteristics lesions was the larynx/trachea. Nevertheless, lesions also were observed in the lungs and sinuses followed by conjunctiva. Validation of PCR on FFPE tissues offers the advantage of allowing the test tissue fixed by formalin, which enables retrospective and conservation alternative where there is no appropriate freezing. The sequence alignment of ILT BRASIL/2011/UFGM (KC182579) showed some differences in nucleotide that determined differences in the level of amino acid sequences (mutations) compared to the TCO and CEO vaccine strains. However, future sequencing of larger regions of the ICP4 gene should be made to determine if there is relation between the strain involved in the outbreak in southern LTI MG and other wild and vaccine strains.

**Keywords:** infectious laryngotracheitis, herpesvirus, laying hens, histopathology, immunohistochemistry, PCR.



## 1. Introdução

A laringotraqueíte infecciosa (LTI) é uma doença viral do trato respiratório de galinhas que possui distribuição mundial sendo responsável por grandes perdas econômicas. A doença ocorre em áreas onde há intensa produção avícola e pode resultar em grandes perdas econômicas causadas pela queda na produção de ovos, pelo aumento da mortalidade, pela perda de peso e predisposição a outras doenças respiratórias. Com a ocorrência da doença, há restrição quanto ao trânsito e comercialização das aves afetadas, o que resulta em maiores perdas econômicas (Humberd et al., 2002; Oldoni et al., 2009).

As principais fontes de infecção do agente da LTI são as aves portadoras do vírus selvagem ou aves vacinadas com vacinas vivas-atenuadas. Um fator agravante em relação à LTI é a capacidade do vírus de permanecer em estado de latência no hospedeiro, com sítios demonstrados por PCR, principalmente nos gânglios trigêmeos (Williams et al., 1992).

A forma aguda é caracterizada por sinais respiratórios como tosse, dispnéia, espirros, descarga nasal, conjuntivite e expectoração de exsudato mucosanguinolento (Humberd et al., 2002; Chacón et al., 2007). A forma moderada ou subaguda, mais frequentemente encontrada, manifesta-se por conjuntivite, edema dos seios nasais, traqueíte, estertores suaves e descarga nasal persistente (Moreno et al., 2010). As aves afetadas pela forma mais virulenta apresentam histórico, sinais clínicos e lesões na traquéia altamente característicos da doença, porém a forma mais branda pode se tornar indistinguível de outras doenças respiratórias (Chacón et al., 2007). As vias de eliminação do vírus são as secreções oronasais e tem início de seis a oito dias após infecção (Purcell e McFerran, 1969).

Em novembro de 2010, o Instituto Mineiro de Agropecuário (IMA) notificou

pela primeira vez ao MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) uma suspeita da doença no sul do Estado de Minas Gerais. Logo após a notificação pelo veterinário responsável, as granjas foram interditadas pelos veterinários do serviço oficial ligados ao IMA. Amostras teciduais foram coletadas e a infecção das aves pelo vírus da laringotraqueíte infecciosa (GaHV1) foi confirmada pelo isolamento viral e PCR em tempo real. A confirmação por meio desses testes foi realizada no Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO) de Campinas, São Paulo. Dentre os municípios envolvidos, tem-se Itanhandu, Passa Quatro, Pouso Alto, Itamonte e Pedralva. Assim, torna-se importante o estudo desta doença quanto às características macroscópicas e histopatológicas associadas à caracterização viral, o que irá contribuir para seu controle.

## 2. Revisão de literatura

### 2.1 Histórico

A doença foi descrita pela primeira vez por MAY e TITSLER em 1925, e recebeu de Graham et al. (1931) a denominação de laringotraqueíte infecciosa aviária, pois anteriormente era denominada como “bronquite infecciosa” (Beach, 1926). A etiologia viral foi demonstrada pela primeira vez por Beaudette em 1937.

No Brasil, a primeira descrição de isolamento e identificação do vírus da LTI foi em 1974 por Hipólito et al. No final de 2002, ocorreu um surto de laringotraqueíte caracterizada por sinais clínicos respiratórios, diminuição da produção de ovos e aumento da mortalidade em granjas comerciais na região de Bastos no Estado de São Paulo (Chacón et al., 2007). Villareal et al. (2004) publicaram pela primeira vez a identificação do vírus e posterior sequenciamento de uma região do genoma do vírus da LTI na região de Bastos em São Paulo. Foi feito um estudo sobre as estirpes envolvidas no surto, e a estirpe

vacinal do tipo CEO foi detectada em duas amostras (Chacón et al., 2010). Em 2004, Beltrão et al. publicaram um estudo em que foi detectado o vírus da LTI nas regiões Sul e Sudeste do país, utilizando-se como métodos de diagnóstico o isolamento viral, a Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) e a histopatologia.

## 2.2 Etiologia

O vírus da laringotraqueíte infecciosa GaHV1 é classificado como um membro do gênero *Iltovirus*, pertencente à família *Herpesviridae* e à subfamília *Alphaherpesvirinae*. Taxonomicalmente, o vírus é identificado como *Gallid herpesvirus 1* (Guy & Garcia, 2008). As partículas do vírus da LTI são morfológicamente similares às do herpes simplex humano, e contém um nucleocapsídeo hexagonal de 80-100 nm de diâmetro e um envelope, conferindo ao vírus um diâmetro total de 195-250 nm (Watrach et al., 1963). O vírus é sensível a clorofórmio e éter, e é inativado pelo calor quando exposto a 38°C por 24 horas (Fitzgerald & Hanson, 1963; Meulemans & Halen, 1978; Giambrone et al., 2008).

O DNA genômico consiste em uma molécula de fita dupla linear de 155 kb composta por uma região única longa (UL) de 120 kb e uma curta (UR) de 17 kb circundadas por duas repetições invertidas de 9 kb cada uma (Johnson et al., 1991). As glicoproteínas virais são responsáveis pelas respostas imune humoral e celular do hospedeiro, e as principais são as de peso molecular 205, 160, 115, 90 e 60k (York & Fahey, 1987). O vírus infecta a célula ao se ligar aos receptores de membrana, ocorrendo posteriormente a fusão do envelope com a membrana celular. Desta forma, o nucleocapsídeo vai para o citoplasma e é transportado até a membrana nuclear. Em seguida, o DNA viral migra pelos poros da membrana nuclear e inicia a transcrição e replicação no núcleo da célula. As novas partículas formadas saem da

célula ao lisá-la ou por fusão à membrana citoplasmática e posteriormente exocitose (Guy & Garcia, 2008).

## 2.3 Epidemiologia

A LTI apresenta distribuição geográfica cosmopolita e sua ocorrência foi comprovada em países como EUA (Beach, 1926), Austrália (Pulsford, 1961), Itália (Moreno et al., 2010), Inglaterra (Hughes et al., 1991) e Brasil (Hipólito et al., 1974).

Os hospedeiros primários são as galinhas, mas outras espécies podem ser infectadas, como faisão, pavão (Crawshaw e Boycott, 1982) e peru (Winterfield e So, 1968). Portz et al. (2008) descreveram pela primeira vez a infecção natural pelo vírus da LTI em perus, confirmada pelas técnicas de *nested-PCR*, microscopia eletrônica, isolamento viral e imunofluorescência indireta.

A transmissão do vírus da LTI ocorre principalmente pelo contato direto de aves doentes e as vias de infecção são o trato respiratório superior e via ocular (Beaudette, 1937). Outra forma importante de transmissão do vírus é a indireta pelo contato com fômites e cama contaminados. Kingsbury & Jungherr (1958), demonstraram a disseminação do GaHV1 atribuída a pessoas e o descuido com a desinfecção de roupas, além de animais como outras aves e pequenos mamíferos.

## 2.4 Patogenia

O vírus se replica no epitélio da traqueia, laringe, seios nasais, conjuntiva, sacos aéreos e pulmões (Guy & Garcia, 2008) e pode ser detectado na traqueia e na secreção traqueal por 6 a 8 dias após a infecção (Bagust, 1986). Por se tratar de um herpesvirus, o vírus da LTI permanece em estado de latência no hospedeiro, sendo o sítio principal o gânglio trigêmio (Williams et al., 1992). Hughes et al. (1989) demonstraram re-excreção do vírus em aves com infecção latente submetidas a estresse como re-alojamento e pico de postura.



O período de incubação da doença é de seis a doze dias para infecção natural (Kernohan, 1931). Já em inoculação experimental intratraqueal, o período de incubação é de dois a quatro dias (Benton et al., 1958).

## 2.5 Sinais clínicos

A LTI causa doença respiratória aguda e os sinais clínicos geralmente observados são descarga nasal, tosse, espirros, dispnéia e conjuntivite (Kernohan, 1931). Em casos de doença severa, expectoração de muco sanguinolento também pode ser observado. O curso da doença varia com a severidade das lesões, podendo as aves se recuperarem de dez a quatorze dias (Beach, 1926).

As formas mais graves da doença cursam com alta morbidade, podendo chegar a 100%; e a mortalidade nesses casos pode chegar a 70% (Seddon & Hart, 1935). Já as formas mais brandas da doença resultam em morbidade abaixo de 5% e mortalidade de até 2% (Cover & Benton, 1958).

## 2.6 Macroscopia

As lesões macroscópicas são observadas mais frequentemente no trato respiratório superior, em especial na laringe e traqueia, e variam de acúmulo de muco nos casos mais brandos (Linares et al., 1994; Timurkaan et al., 2003) e laringite/traqueíte fibrino-necrótica nos casos mais graves (Purcell & McFerran, 1969). Pode-se observar também conjuntivite (Linares et al., 1994). Snoeyenbos et al. (1971) observaram pneumonia e aerossaculite causadas pelo vírus da LTI, e Purcell e McFerran (1969) reproduziram a doença por aerossol e também observaram essas alterações associadas a laringite/traqueíte.

## 2.7 Lesões histológicas

As alterações microscópicas variam de acordo com a fase da doença. Hayashi et al. (1985) observaram um dia após a

infecção pelo vírus da LTI hipertrofia e hiperplasia das células globosas da traqueia, além de degeneração dos cílios e infiltrado linfocítico associado a hiperemia da submucosa. No terceiro dia após infecção, observou-se fusão das células epiteliais da traqueia formando grande sincícios com corpúsculo de inclusão intranuclear. Timurkaan et al. (2003) relataram degeneração, necrose e descamação da mucosa da laringe e traqueia entre o terceiro e quinto dia após infecção. Observaram também exsudato contendo restos de células epiteliais, heterófilos e hemácias no lúmen da laringe, traqueia e cavidade nasal. Corpúsculos de inclusão geralmente estão presentes apenas nos estágios iniciais (de 1-5 dias) e desaparecem conforme a progressão da doença devido a necrose e descamação das células epiteliais. Este corpúsculo de inclusão é resultado da atividade bioquímica de replicação viral no núcleo da célula (Reynolds et al., 1967).

## 2.8 Diagnóstico

O diagnóstico da LTI é baseado nos sinais clínicos, alterações histológicas e detecção do agente etiológico, podendo este último ser feito através de isolamento viral, imunofluorescência direta, técnicas de hibridização de DNA e técnicas da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) (Beltrão et al., 2004). Na fase aguda, o diagnóstico definitivo pode ser obtido apenas com a histopatologia pela observação do corpúsculo de inclusão intranuclear nas células sinciciais, uma vez que essa alteração é patognomônica para a doença. Se as aves não forem vacinadas, pode-se ainda fazer uso de métodos indiretos para o diagnóstico, como detecção de anticorpos por imunodifusão em gel de ágar (IDGA), imunofluorescência indireta (IFI) (Adair et al., 1985), vírus-neutralização (VN) (Burnet, 1936) e ELISA (Meulemans & Halen, 1982).

## 2.9 Controle

Há dois tipos de vacinas vivas-atenuadas utilizadas para controle de LTI: vacina atenuada por passagens sequenciais em ovos embrionados (CEO) (Samberg et al., 1971) e a vacina gerada após múltiplas passagens em cultura de células (TCO) (Gelenczei e Marty, 1964). Estas vacinas tem se mostrado bastante efetivas, principalmente a do tipo CEO, produzindo boa proteção à ave (Han & Kim, 2003). Hughes et al. (1991) demonstraram que o vírus vacinal é capaz de ficar latente na ave vacinada e de ser reativado, sendo eliminado de forma intermitente para o ambiente. Assim, foram desenvolvidas vacinas recombinantes utilizando-se como vetores o poxvirus e o herpesvirus dos perus, e já estão sendo comercializadas. Essas vacinas têm como característica a ausência de infecção latente e de reversão de patogenicidade. A proteção induzida por essas vacinas recombinantes tem-se mostrado parcial e menos efetiva que as vacinas vivas atenuadas (Johnson et al., 2010). Associado a vacinação, é de extrema importância que se tome medidas de biossegurança para evitar a disseminação do vírus e na prevenção de novos casos (Kingsbury & Jungherr, 1958)

## 3. Objetivos

- Estudar o surto de laringotraqueíte infecciosa no sul de Minas Gerais quanto aos sinais clínicos, lesões macroscópicas e histológicas.
- Padronizar técnica de PCR convencional utilizando tecido fixado em formol e embebido em parafina com *primer* específico para uma região do gene ICP4
- Padronizar a técnica de IHQ para diagnóstico de LTI como uma ferramenta complementar
- Sequenciar a estirpe envolvida no surto e compará-la com outras estirpes já publicadas.

## 4. Material e métodos

### 4.1 Localização

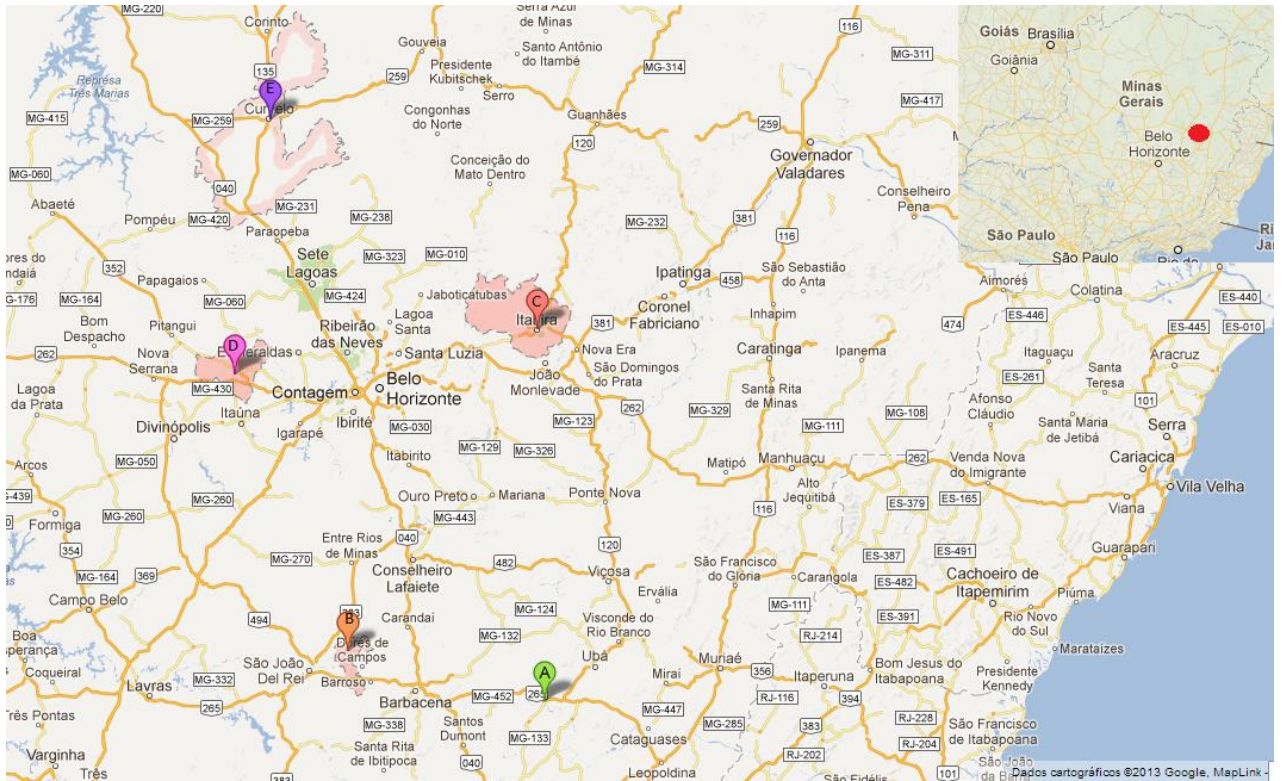
As amostras analisadas neste estudo são procedentes de granjas de postura comercial localizadas na região da Serra da Mantiqueira no sul de Minas Gerais, nas cidades Itanhandu, Itamonte, Passa Quatro e Pouso Alto (Figura 1). A região localiza-se a aproximadamente 450 km de Belo Horizonte. Nesta região está concentrada a maior produção de ovos do Estado, com 32 granjas e uma população aproximadamente 10.000.000 de aves. As granjas são divididas em média em 15 galpões, sendo as aves divididas entre 17 e 95 semanas de idade. Algumas granjas são automatizadas e com criação em vários andares. A produção de ovos nessa região representa mais de 11% da produção nacional, sendo Minas Gerais o segundo maior produtor do país. Além dessas cidades, foram coletadas também amostras de Pedralva, onde se concentram granjas de recria que possuem vínculo com as granjas de postura.

Foram coletadas também amostras de aves de subsistência em residências próximas às granjas comerciais dessa região.

Amostras de aves de postura foram coletadas também de outras regiões de Minas Gerais, como o município de Curvelo, Prados, Itabira, Rio Pomba e Pará de Minas (Figura 2).



**Figura 1.** Mapa da região das terras altas da Mantiqueira. Em destaque os municípios Pouso Alto, Itanhandu, Itamonte e Passa Quatro.



**Figura 2.** Mapa das cidade de Minas Gerais onde foram coletadas amostras de aves de postura. A- Rio Pomba; B- Prados; C- Itabira; D- Pará de Minas; E- Curvelo.

As amostras coletadas foram processadas no setor de Patologia, do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias da Escola de Veterinária da UFMG, em Belo Horizonte, Minas Gerais

#### 4.2 Histórico

Em novembro de 2010, ocorreu um surto de doença respiratória na região sul de Minas Gerais que levou à queda da produção de ovos e aumento da mortalidade. Os sinais clínicos apresentados pelas aves, bem como as lesões macroscópicas, sugeriram tratar-se de um surto de Laringotraqueíte infecciosa. Responsáveis técnicos das granjas notificaram a suspeita ao IMA (Instituto Mineiro de Agropecuária) que posteriormente notificou ao MAPA (representado pela Superintendência Federal de Agricultura no Estado de Minas Gerais – SFA –MG). Imediatamente foram tomadas medidas de controle como interdição das granjas afetadas e coleta de material para a confirmação da suspeita. Foram coletados suabes de traqueia, soro, e cabeça com a traqueia das aves doentes e enviados ao LANAGRO (Laboratório Nacional Agropecuário) de São Paulo, no qual foi confirmado o surto de LTI pela PCR. Os cinco municípios envolvidos no surto foram: Itamonte, Itanhandu, Passa Quatro, Pouso Alto e Pedralva. As granjas permaneceram em vistoria constante para verificar o aparecimento de sinais clínicos, e medidas de controle do trânsito das aves e excretas foram tomadas para conter o surto. Foi autorizada pelo MAPA em 24 de maio de 2011 a vacinação das aves de postura com vacina recombinante para controle do surto, associada a medidas de biossegurança. A vacinação com a vacina recombinante foi iniciada em agosto de 2011, acompanhada pelo serviço veterinário oficial do IMA.

#### 4.3 Aves

A linhagem das galinhas de postura comercial estudadas é Hy Line, e foram

coletadas amostras em diferentes fases de produção:

- Fase de pré-postura: de 16 a 18 semanas de idade;
- Fase de postura: de 19 a 70 semanas de idade, sendo o pico entre 28 e 35 semanas de idade.

#### 4.4 Coleta de material

Na época do surto, em novembro de 2010, foram coletadas amostras de tecidos respiratórios e conjuntiva de 4 aves com sinais clínicos de LTI por veterinários do MAPA e fixadas em formol a 10%. Esse material foi enviado ao laboratório de Patologia da UFMG em abril de 2011 e incluído no estudo.

Em março de 2011, foi realizada uma visita às principais granjas envolvidas no surto de LTI para observação de sinais clínicos, coleta de material e de dados epidemiológicos. As aves com sinais clínicos respiratórios foram eutanasiadas de acordo com as normas do Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (CEUA- 204/11) e necropsiadas, totalizando 14 aves nesse período. Os sinais clínicos, bem como as lesões macroscópicas, foram registrados e amostras de laringe, traqueia, pulmão, conchas e seios paranasais, conjuntiva, gânglio trigêmio e encéfalo foram coletadas e fixadas em formol a 10%.

Durante o ano de 2011, veterinários do IMA enviaram ao laboratório de Patologia da UFMG tecidos fixados em formol coletados de aves com sinais respiratórios de granjas envolvidas no surto de LTI, totalizando 34 aves.

Em fevereiro de 2012, nova visita foi feita às granjas da região da Serra da Mantiqueira e coletados dados e amostras de mais 23 aves de postura com e sem sinais clínicos de LTI. Foram coletados também suabes laringotraqueais de quatro granjas, fazendo-se um *pool* de 10 aves de cada. Na mesma ocasião, foram coletados suabes laringotraqueais de 21 galinhas de subsistência em residências próximas às

granjas envolvidas no surto de LTI e, destas, tecidos respiratórios e conjuntiva de 12 galinhas para verificar se o vírus está presentes nessas aves.

Foram incluídas no estudo amostras de 18 galinhas de outras regiões do Estado de Minas Gerais que faziam parte da rotina de diagnóstico do laboratório de Patologia da Escola de Veterinária da UFMG no ano de 2012 para verificar a presença ou não do GaHV1.

#### **4.5 Histopatologia**

Amostras de laringe, traqueia, pulmões, conjuntiva, conchas nasais, encéfalo e gânglio trigêmio foram coletadas e fixadas em formalina tamponada a 10%. Após 48h, as amostras foram transferidas para recipientes contendo álcool 70% até o processamento. Amostras de quatro galinhas coletadas pelos veterinários do MAPA na ocasião do surto permaneceram por cinco meses no formol, e somente após esse período foram transferidas para o álcool 70%. Cento e oito aves foram analisadas pela histopatologia. As amostras foram processadas rotineiramente para histopatologia, incluídas em parafina, cortadas em secções de 4µm de espessura, coradas pela hematoxilina e eosina e avaliadas à microscopia de luz clara. A laringe e a porção cranial da traqueia foram cortadas transversalmente, enquanto que a parte caudal da traqueia foi cortada longitudinalmente a fim de possibilitar a identificação das porções no momento da análise ao microscópio.

#### **4.6 Amostras de suabes**

Foram coletadas amostras de suabes laringotraqueal em quatro granjas comerciais em Itanhandu e de 21 aves de subsistências em residências próximas às granjas em fevereiro de 2012. Das aves das granjas de postura comercial, foi feito um *pool* de suabes de 10 aves com sinais respiratórios em cada granja, colocados em meio de transporte adequado (meio contendo infusão de cérebro e coração

bovino acrescidos de antibióticos e antifúngicos), resfriados e posteriormente congelados a -20°C. Das aves de subsistência, os suabes foram individuais e o procedimento utilizado foi o mesmo.

#### **4.7 Imuno-histoquímica**

Entre as 78 aves de granjas comerciais do sul de Minas Gerais, foram selecionadas 30 para realização de imunoistoquímica (IHQ) segundo Tadese et al. (2007) com modificações. Brevemente, foram feitos cortes de 4µm de espessura e colocados em lâminas adesivadas (Starfrost®). As lâminas foram mantidas por 15 minutos em estufa a 60°C, e colocadas duas vezes em xilol por 15 minutos cada para desparafinização. Posteriormente, foi feita a hidratação dos cortes em diluições crescentes de álcool etílico por 5 minutos cada. A recuperação antigênica foi feita com calor úmido em banho-Maria a 98°C por 20 minutos em solução de tampão citrato<sup>1</sup> (Target retrieval solution concentrated 10X, S1699-1, Dako, Carpinteria-CA, Estados Unidos). O bloqueio da peroxidase endógena foi feito com peróxido de hidrogênio a 3% diluído em metanol por 15 minutos. O bloqueio de ligações inespecíficas foi feito com leite em pó desnatado diluído em PBS por 30 minutos. Foi utilizado um anticorpo monoclonal<sup>2</sup> (Clone IgG2b, Rural Technologies, Inc. Brookings, SD- Estados Unidos) específico para proteína gJ do vírus da laringotraqueíte infecciosa presente no citoplasma das células epiteliais infectadas com diluição de 1/25. Como anticorpo secundário foi utilizado o kit streptavidina-biotina da DAKO®, e a revelação foi feita com diaminobenzidina (Sistema substrato DAB, Spring Bioscience). A contra-coloração foi feita com hematoxilina por 4 segundos e posteriormente os cortes foram desidratados e montados com lamínulas em bálsamo.

#### **4.8 Extração de DNA**

Os tecidos fixados e parafinizados individualmente provenientes das 78 aves de granjas comerciais do sul de Minas Gerais, de oito das 12 aves de subsistência e 10 das 18 aves de outras regiões do Estado foram seccionados em 20 cortes de cinco micrômetros de espessura, colocados em microtubos e desparafinizados com xilol para extração de DNA. Os cortes foram feitos a essa espessura para facilitar a digestão pela proteinase K durante a extração de DNA. Foi utilizado o kit QIAamp DNA da Qiagen®, de acordo com as especificações do fabricante.

Para as amostras de swab traqueal, foi realizada extração de DNA segundo Boom et al. (1990) com modificações. Brevemente, pipetaram-se 200µl do swab traqueal e acrescentaram-se 300µl de NaI para rompimento da parede celular. Utilizaram-se 40µl de sílica e posteriormente foram feitas 3 lavagens com etanol-*wash*. Para eluição do DNA, utilizaram-se 50µl de tampão tris-EDTA. Imediatamente após a extração de DNA, foi feita dosagem no nanodrop (Nanodrop ND-1000, Thermo Scientific, Wilmington, DE, U.S.A.) e as amostras foram congeladas a -80°C.

#### 4.9 Reação em cadeia pela polimerase (PCR)

O DNA extraído das amostras de parafina e *swab* foram submetidas ao teste de reação em cadeia pela polimerase. Os nucleotídeos iniciadores utilizados foram 5'- CCTTGGTTCGGGATGAAACC-3' *forward* e 5'- TTCATTACCTCCAGCGGTTCC-3' *reverse* gerando um produto de 237 pares de base correspondente a uma região diploide do gene ICP4 do vírus da LTI, delineado e cedido pelo pesquisador da USDA (United States Department of Agriculture) Dr. Stephen Joseph Spatz. A reação de PCR foi feita com o PCR Master Mix da Promega de acordo com o fabricante para um volume de 25µl, utilizando-se uma quantidade de amostra

em torno de 200ng e 0,02 nmol de cada primer. Utilizou-se o seguinte programa para amplificação: 4 minutos a 94°C para denaturação; 35 ciclos de 20 segundos a 94°C, 40 segundos a 54°C e 1 minuto a 72°C. O produto foi analisado pelo sistema de eletroforese em cuba horizontal em gel de agarose a 1,5% contendo 1X de tampão tris-borato-EDTA e 2µl de brometo de etídio a 130V por 40 minutos. A visualização dos fragmentos amplificados foi feita por transiluminação do gel em luz ultravioleta. O tamanho dos fragmentos amplificados foi comparado a um padrão de peso molecular (LowRanger 100bp DNA Ladder- Norgen®) disposto no gel juntamente com as amostras analisadas. Como controle negativo da reação, foram utilizados os *primers* juntamente com o PCR Master Mix e água ultrapura.

Para estabelecer o limiar de detecção do DNA da reação (teste de sensibilidade dos primers), foi selecionada uma amostra positiva e realizadas 4 diluições seriadas, no fator 10, variando de 200ng/µl até 0,1ng/µl. O mesmo protocolo foi utilizado para análise final dos fragmentos amplificados em gel de agarose.

Para controle interno (viabilidade e qualidade do DNA), as amostras negativas foram testadas por um oligonucleotídeo actina beta, com primers de seguintes sequências: (5'- AGAGGCTCCCCTGAACCCCAAAGC-3') e (5'- CTGGATGGCTACATACATGGCTGG-3') de acordo com Ecco et al. (2011). Quando a amostra testada resultava negativa, novas extrações e controles foram realizados.

Na tabela abaixo (Tabela 1) está o número de aves as quais foram coletadas amostras fixadas em formol e embebidas em parafina analisadas pela histopatologia, IHQ e PCR. De cada ave foram analisados cinco tecidos pela histopatologia e quatro tecidos pela IHQ e PCR.

**Tabela 1.** Número de aves cujas amostras foram fixadas em formol e embebidas em parafina analisadas pelas técnicas de histopatologia, IHQ e PCR

	Histopatologia	IHQ	PCR
Aves de postura comercial da região do surto de LTI em MG	78	30	78
Aves de subsistência da região do surto de LTI em MG	12	0	8
Aves de outras regiões do Estado de MG	18	0	10



#### 4.10 Sequenciamento de DNA

Duas amostras de swab e duas amostras de tecido fixado em formol e embebido em parafina de três granjas positivas para LTI na PCR foram enviadas ao Laboratório de Genética do Departamento de Zootecnia/Medicina Veterinária Preventiva (INCT-IGSPB) para realização de sequenciamento de DNA pela Valid Biotechnology. Dois µl do amplicon de cada amostra foram pipetados em tubos de 1,5 ml juntamente com 0,5 µl (0,005 nmol) de primer (*forward* e *reverse* separadamente) e 5µl de água ultrapura, totalizando 7,5 µl em cada tubo. As sequências foram determinadas pelo método ABI Taq DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit de acordo com o fabricante (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, U.S.A.) e utilizando o aparelho ABI 3130 (Applied Biosystems®) por eletroforese capilar. As reações de sequenciamento foram realizadas com um passo inicial de desnaturação a 96° C por 1 min; 30 ciclos 96° C por 15 s, 50° C por 15 s e 60° C por 4 min; finalizando em um último passo a 8° C indefinidamente (Programa SeqDNA). A seguir, o produto desta reação foi precipitado com 40 µl de isopropanol a 65%, incubado à temperatura ambiente no escuro por 30 minutos e centrifugado a 14.000 rpm por 45 minutos. O sobrenadante foi removido, acrescentou-se 500 µL de etanol 60% (Merck), centrifugou-se a 14.000 rpm por 10 minutos e o precipitado foi secado na estufa a 95°C por 5 minutos. As sequencias foram analisadas usando o *software* SeqScape® v2.5 e identificadas através de busca na base de dados no GenBank utilizando a plataforma BLASTn. O *software* MEGA 5.0 foi utilizado para alinhamento e comparação das sequencias de nucleotídeos da amostra fixada em formol e da amostra dos swabs com a amostra dos Estados Unidos número de acesso no GenBank de EU104910.1; com ILTV JN596963.1 Austrália; com ILTV JN580316.1 (Gallid herpesvirus 1 cepa vacinal CEO) e com

JN580315.1 (Gallid herpesvirus 1 cepa vacinal TCO).

## 5. Resultados

### 5.1 Epidemiologia

Oito granjas de postura comercial envolvidas no surto de LTI foram incluídas neste estudo. Em três granjas observou-se queda significativa na produção de ovos. Em duas dessas granjas observou-se falha na biossegurança, pois outros tipos de aves, até mesmo mamíferos como gatos, tinham acesso às granjas. Em uma granja com um galpão de 97.000 aves, a taxa de morbidade chegou a aproximadamente 2% e a de letalidade 1,8%. Em todas as granjas acometidas a taxa de mortalidade aumentou, chegando em média a 3%. Porém, em outra granja, particularmente em um galpão com aproximadamente 100.000 aves, a taxa de mortalidade chegou a 10%. O aumento na mortalidade (3% a 9%) foi relacionado a restrições na remoção e transporte de galinhas, esterco e abate sanitário das galinhas doentes.

### 5.2 Sinais clínicos

As galinhas de postura comercial acometidas apresentaram sinais clínicos respiratórios como tosse e espirros, além de aumento de volume dos seios paranasais e secreção nasal, por vezes sanguinolenta. As galinhas que estavam na fase subaguda da doença apresentaram intensa dificuldade respiratória e permaneciam com o bico aberto e esticavam o pescoço caudodorsalmente e vocalizavam ao tentar respirar (Figuras 5 e 6). Foram observados também apatia, diminuição da produção de ovos, conjuntivite e cianose. Os sinais clínicos foram observados principalmente nas aves de 19 a 35 semanas de idade.

Não foram observados sinais clínicos nas galinhas de subsistência e de outras regiões do Estado.

### 5.3 Lesões macroscópicas

À necropsia das galinhas de postura comercial, observaram-se lesões principalmente na laringe, traqueia, seios nasais, paranasais e conjuntiva. Algumas traqueias apresentaram apenas hiperemia da mucosa e acúmulo moderado de muco, caracterizando uma traqueíte aguda difusa moderada. Contudo, várias traqueias apresentaram a mucosa moderadamente espessada com membrana branco-amarelada friável (fibrina) fracamente aderida, predominantemente na porção cranial envolvendo também a laringe, caracterizando uma traqueíte e laringite fibrino-necrótica aguda moderada. Em algumas traqueias, observou-se acúmulo de muco sanguinolento caracterizando uma traqueíte hemorrágica aguda moderada. Em casos subagudos a crônicos, observou-se acúmulo de material caseoso amarelado na porção cranial da traqueia, ocluindo a laringe (Figura 7).

Nas conchas, seios nasais e seios paranasais, observou-se acúmulo de muco, por vezes sanguinolento, associado a

hiperemia, caracterizando rinite/sinusite aguda moderada. Em alguns seios nasais e paranasais, observou-se acúmulo de material fibrinoso branco-amarelado em moderada quantidade, caracterizando uma rinite/traqueíte fibrinonecrótica aguda difusa moderada. Observou-se ainda em casos subagudos a crônicos, acúmulo de material caseoso nos seios paranasais, que conferia a estes um aumento de volume visível exteriormente.

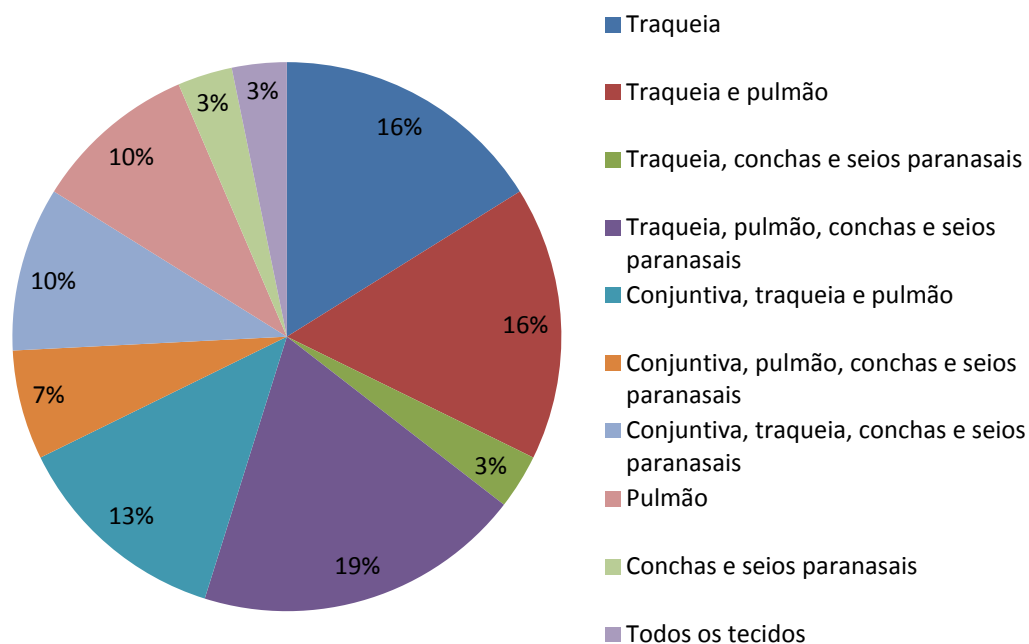
Na conjuntiva, as principais alterações macroscópicas foram aumento de volume por edema moderado e hiperemia difusa.

Não foram observadas lesões macroscópicas nas galinhas de subsistência e de outras regiões do Estado.

### 5.3 Histopatologia

As proporções de tecidos com lesão característica de LTI estão contidas na figura 3.

**Figura 3. Proporções de tecidos com lesões histológicas de LTI nas galinhas de postura comercial**



Nas laringes e traqueias de 45/78 (57%) galinhas, observaram-se laringite e traqueíte caracterizadas por infiltrado linfoplasmocitário na lâmina própria levando ao espessamento da mucosa. Esse infiltrado apresentou-se de forma difusa e também formando agregados linfóides. Em várias laringes e traqueias, as glândulas mucosas não eram mais observadas pois foram substituídas pelo infiltrado inflamatório acentuado. Observaram-se também alterações no epitélio desses tecidos, como degeneração e necrose. Em outros casos, o epitélio apresentou-se hiperplásico e, por vezes, com substituição do epitélio respiratório normal por um epitélio simples não ciliado. Essas alterações prevaleceram na laringe e porção cranial da traqueia e foram consideradas não características para a LTI.

Nas laringes e traqueias de 25/78 galinhas, observou-se lesão característica de LTI. A distribuição e a intensidade das lesões eram variáveis entre as aves e os diferentes tecidos. As lesões foram caracterizadas por hiperplasia e descamação do epitélio, além de projeção e fusão de células epiteliais formando sincícios de 40 a 90  $\mu\text{m}$  de diâmetro e contendo corpúsculo de inclusão intranuclear (Figuras 8 e 9). As células sinciciais possuíam de 10 a 50 núcleos, e quase todos estavam preenchidos por um material denso basofílico (corpúsculo de inclusão intranuclear tipo B) e/ou eosinofílico (corpúsculo de inclusão intranuclear tipo A) de acordo com o descrito por Cowdry, 1934 (Figuras 9 e 10). Além dos sincícios com corpúsculo de inclusão, observaram-se em várias dessas laringes/traqueias quantidade intensa de fibrina associada a restos celulares e células inflamatórias depositadas sobre a mucosa. Nesses casos, observam-se áreas em que houve desprendimento do epitélio de revestimento para o lúmen com exposição da lâmina própria (laringotraqueíte difterica ou membranosa). Observou-se também, em várias aves, o epitélio hiperplásico e com perda dos cílios. A mucosa estava

difusamente e acentuadamente espessada devido a infiltrado linfoplasmocitário. Em áreas multifocais, havia perda das glândulas mucosas e substituição por linfócitos. Em duas aves não foi possível a avaliação da laringe e traqueia devido a autólise.

Em 6/78 galinhas, observaram-se lesões na laringe e traqueia compatíveis com LTI, com alterações similares às citadas anteriormente, porém apenas com formação de células sinciciais, sem a visualização de corpúsculo de inclusão intranuclear.

Nas conchas nasais e seios paranasais, 49/78 galinhas apresentaram lesões não características de LTI. As principais lesões observadas foram infiltrado linfoplasmocitário difuso e/ou nodular, desprendimento do epitélio respiratório com degeneração e necrose associado a fibrina e em alguns casos material caseoso. Em 15 aves observaram-se células sinciciais com corpúsculo de inclusão intranuclear, presentes principalmente nos seios paranasais. Em três aves, foi possível observar células sinciciais, porém sem corpúsculo de inclusão. Sete aves não apresentaram lesão nas conchas e seios paranasais, e em quatro aves não foi possível a análise desses tecidos.

Na conjuntiva, 40/78 galinhas apresentaram lesões não características de LTI, como infiltrado linfoplasmocitário difuso na lâmina própria e também formando agregados, além de exocitose de heterófilos e hiperplasia do epitélio (Figura 11). Em dez aves observaram-se células sinciciais com corpúsculo de inclusão intranuclear na conjuntiva associado a conjuntivite linfoplasmocitária multifocal. Em 24/78 aves, não foram observadas lesões nesse tecido, e em quatro aves não foi possível a análise desse tecido.

Nos pulmões, 41/78 galinhas apresentaram lesões inespecíficas como congestão, edema, infiltrado linfoplasmocitário na lâmina própria dos brônquios principais e mesobrônquios,

hiperplasia de BALT e hiperplasia do epitélio respiratório dos brônquios. Células sinciciais com corpúsculo de inclusão intranuclear foram observadas em 21/78 aves. Dessas, em onze foi possível observar a formação dos sincícios com corpúsculo de inclusão na mucosa dos brônquios principais e mesobrônquios, sendo que nas outras dez as células sinciciais só foram observadas soltas no lúmen, sugerindo tratar-se de células que derivaram da traqueia. Em cinco aves, foram observadas células sinciciais sem corpúsculo de inclusão intranuclear. Nove aves não apresentaram lesões nos pulmões, e em duas aves não foi possível analisá-los.

Observou-se em quatro galinhas aerossaculite linfoplasmocitária associada a células sinciciais com corpúsculo de inclusão intranuclear.

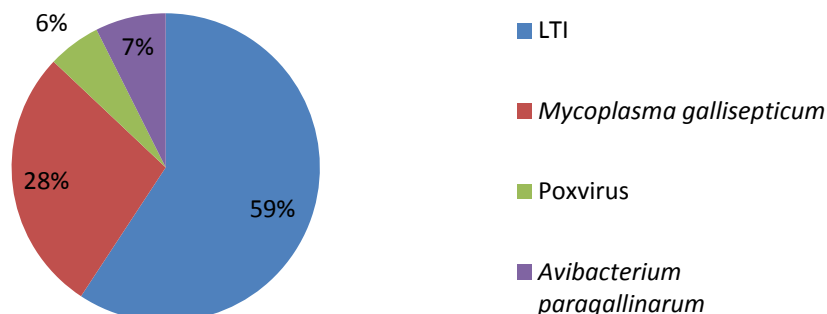
Em cinco galinhas, a lesão característica de LTI foi observada somente na laringe, sendo que nos outros tecidos havia apenas infiltrado linfoplasmocitário multifocal. Em três aves observou-se lesão característica de LTI somente nos pulmões e em uma ave somente nas conchas nasais e seios paranasais. Ou seja, o restante das aves com LTI apresentaram lesões características em pelo menos dois órgãos coletados. Somente uma ave apresentou lesão de LTI nos quatro órgãos analisados.

Não foram observadas alterações no encéfalo e no gânglio trigêmeo.

#### 5.4 Diagnóstico diferencial

Pela análise histopatológica, observaram-se também lesões sugestivas de outras doenças respiratórias nas galinhas de postura comercial (Figura 4).

**Figura 4. Proporções das lesões histológicas sugestivas de outros patógenos respiratórios nas galinhas de postura comercial**



Das 78 galinhas de postura comercial, 15 apresentaram lesões sugestivas de *Mycoplasma gallisepticum*, caracterizadas como espessamento difuso e acentuado da mucosa da laringe, traqueia, conchas e seios paranasais por infiltrado linfocitário em arranjo linfocitário. O epitélio ciliar apresentava ausência dos cílios de forma multifocal a coalescente ou difusamente. Essas aves apresentaram

conjuntamente hiperplasia dos tecidos linfóides presentes na conjuntiva e nos pulmões. Em duas aves, observou-se este padrão de lesão por *M. gallisepticum*, porém associado a necrose do epitélio, descamação e formação de células sinciciais com corpúsculo de inclusão intranuclear, sendo provavelmente uma co-infecção dos dois agentes. Em uma ave, observou-se laringite e traqueíte linfoplasmocitária associada a hiperplasia e metaplasia escamosa do epitélio de

revestimento associado a numerosos corpúsculos de inclusão eosinofílicos intracitoplasmáticos em células epiteliais, além de células sinciciais com corpúsculo de inclusão intranuclear, tratando-se de uma co-infecção pelo vírus da LTI e pelo vírus da boubá aviária. Porém, outras duas aves apresentaram lesões de boubá aviária na laringe e na conjuntiva sem nenhuma alteração sugestiva de LTI.

Quatro galinhas apresentaram sinusite necrotizante intensa, sugestivo de lesão por *Avibacterium paragallinarum*, sendo que uma delas havia também lesão característica de LTI na laringe, traqueia e pulmão.

Nas 12 galinhas de subsistência e nas 18 aves de outras regiões do Estado de Minas Gerais incluídas no estudo, a lesão histológica observada na laringe e traqueia foi infiltrado linfoplasmocitário distribuído difusamente na lâmina própria e também formando agregados linfóides multifocais, além de hiperplasia de BALB em alguns pulmões. Nessas aves a alteração na mucosa da traqueia foram sugestivas de infecção por *Mycoplasma gallisepticum*.

### 5.5 Imuno-histoquímica

Das 30 aves submetidas à IHQ, 20 (66%) tiveram marcação positiva na laringe/traqueia, caracterizada por coloração marrom-amarelado granular principalmente no citoplasma das células sinciciais (Figuras 10 e 11). Foi observada também, marcação positiva em células epiteliais aparentemente normais (Figura 12). Dos 18 pulmões analisados, 10 (55%) tiveram marcação positiva para LTI em células epiteliais e em sincícios, e em duas amostras de saco aéreo, observou-se marcação em células epiteliais descamadas. Já nas conchas e seios paranasais, das 20 analisadas, apenas 3 (15%) tiveram marcação positiva.

### 5.6 Reação em cadeia pela polimerase (PCR)

Das 78 amostras de laringes/traqueias de aves de postura fixadas em formol submetidas à técnica de PCR, 39 (50%) apresentaram bandas de 237 pares de base no gel de agarose, sendo portanto positivas para o GaHV1. Das 49 conjuntivas testadas, 31 (63%) foram positivas; já as conchas e seios paranasais, das 50 testadas, 28 (56%) foram positivas. Dos 52 pulmões analisados, 30 (57%) foram positivos para o GaHV1. Gânglios trigêmeos de 10 galinhas de postura comercial e três de aves de subsistência foram testados e somente 9/10 amostras de galinhas de postura comercial foram positivas.

Das quatro amostras de suabes laringotraqueais testadas de aves de postura comercial, duas foram positivas para o vírus da LTI. Todas as 21 amostras de suabes laringotraqueais de aves de subsistência foram negativas. Das oito amostras de traqueia fixadas em formol de aves de subsistência testadas, apenas duas foram positivas.

Nenhuma amostra de aves de outras regiões do Estado de Minas Gerais foi positiva para o vírus da LTI.

No teste de sensibilidade dos primers, observou-se banda positiva até a segunda diluição, de concentração 10ng/μl.

Na tabela abaixo (Tabela 2), está a porcentagem de tecidos positivos para LTI na histopatologia, imunoistoquímica e PCR e a porcentagem dos tecidos positivos simultaneamente para os três testes.

**Tabela 2.** Porcentagem de tecidos positivos para LTI na histopatologia, imunohistoquímica e PCR e simultaneamente em todos os três testes.

Tecido	Histopatologia*	IHQ	PCR	Histopatologia, IHQ e PCR
Conjuntiva	12,8% (10/78)	5% (1/20)	50% (39/78)	0
Laringe/traqueia	32% (25/78)	70% (21/30)	63,2% (31/49)	40% (12/30)
Conchas e seios paranasais	19,2% (15/78)	29,6% (8/27)	56% (28/50)	14,8% (4/27)
Pulmão	26,9% (21/78)	53,8 (14/26)	57,6% (30/52)	23% (6/26)

\*Tecidos que apresentaram lesão característica de LTI: infiltrado linfoplasmocitário associado a necrose do epitélio e descamação e formação de células sinciciais com corpúsculo de inclusão intranuclear

### 5.7 Sequenciamento

As amostras enviadas para sequenciamento tiveram 100% de identidade com ILTV EU104910.1 (Estados Unidos); 99% com ILTV JN596963.1 (Austrália) e 91% com ILTV JN580316.1 (Gallid herpesvirus 1 estirpe vacinal CEO) ou JN580315.1 (Gallid herpesvirus 1

estirpe vacinal TCO) (Tabela 3). As amostras congeladas (suabes) e as fixadas em formol e embebidas em parafina tiveram o mesmo resultado de sequenciamento, e a sequência ILTV Brasil/2011/UFMG do presente estudo foi depositada no banco de dados do GenBank pelo número de acesso KC182579.

**Tabela 3** – Comparação entre a estirpe ILTV Brasil/2011/UFMG e outras estirpes depositadas no GenBank

Estirpe	% de identidade com a estirpe ILTV Brasil/2011/UFMG
EU104910.1 (EUA)	100%
JN596963.1 (Austrália)	99%
JN580316.1 (CEO) e JN580315.1 (TCO)	91%

A sequência encontrada foi alinhada com as demais sequências já depositadas no GenBank e o resultado encontra-se nas tabelas abaixo (Tabelas 4 e 5), destacando-se as diferenças encontradas

a nível de nucleotídeo e aminoácido (mutações).

**Tabela 4.** Alinhamento da sequência de nucleotídeos de ILTV Brasil/2011/UFMG com as sequências EU104910.1; ILTV JN596963.1; ILTV JN580316.1; JN580315.1

<b>Posição no gene ICP4</b>	
	2512      2519      2527
<b>ILTV Brasil/2011/UFMG</b>	TTCATTACCTCCAGCGTTCCAGAAACAGATAGA T ACAACC C CCTCCTT C GCCATGCCCCATAACTCCCGAGGGTCCACCATGTCCGCCCGAGAAG
<b>EU104910.1</b>	TTCATTACCTCCAGCGTTCCAGAAACAGATAGA T ACAACC C CCTCCTT C GCCATGCCCCATAACTCCCGAGGGTCCACCATGTCCGCCCGAGAAG
<b>JN596963.1</b>	TTCATTACCTCCAGCGTTCCAGAAACAGATAGA G ACAACC C CCTCCTT C GCCATGCCCCATAACTCCCGAGGGTCCACCATGTCCGCCCGAGAAG
<b>JN580316.1</b>	TTCATTACCTCCAGCGTTCCAGAAACAGATAGA G ACAACC T CCTCCTT T GCCATGCCCCATAACTCCCGAGGGTCCACCATGTCCGCCCGAGAAG
<b>JN580315.1</b>	TTCATTACCTCCAGCGTTCCAGAAACAGATAGA G ACAACC T CCTCCTT T GCCATGCCCCATAACTCCCGAGGGTCCACCATGTCCGCCCGAGAAG
<b>ILTV Brasil/2011/UFMG</b>	A A C C G C A A C A A C C G C A A G A A C C G C A A G A A C C A C A A T C C C C G T C C T T T C A C A T T T C C A G A T A G G T
<b>EU104910.1</b>	A A C C G C A A C A A C C G C A A G A A C C G C A A G A A C C A C A A T C C C C G T C C T T T C A C A T T T C C A G A T A G G T
<b>JN596963.1</b>	A A C C G C A A C A A C C G C A A G A A C C G C A A G A A C C A C A A T C C C C G T C C T T T C A C A T T T C C A G A T A G G T
<b>JN580316.1</b>	A A ----- C C G C A A G A A C C A C A A T C C C C G T C C T T T C A C A T T T C C A G A T A G G T
<b>JN580315.1</b>	A A ----- C C G C A A G A A C C A C A A T C C C C G T C C T T T C A C A T T T C C A G A T A G G T
	<b>2665</b>
<b>ILTV Brasil/2011/UFMG</b>	G A G G C C C T G T T T C A T T C T A C C C C A G T C A G C C C T A C C A T C C T G T T C G C A C C G G A G G G T T T C A T C C C G A A C C A A G G A
<b>EU104910.1</b>	G A G G C C C T G T T T C A T T C T A C C C C A G T C A G C C C T A C C A T C C T G T T C G C A C C G G A G G G T T T C A T C C C G A A C C A A G G G
<b>JN596963.1</b>	G A G G C C C T G T T T C A T T C T A C C C C A G T C A G C C C T A C C A T C C T G T T C G C A C C G G A G G G T T T C A T C C C G A A C C A A G G G
<b>JN580316.1</b>	G A G G C C C T G T T T C A T T C T A C C C C A A T C A G C C C T A C C A T C C T G T T C G C A C C G G A G G G T T T C A T C C C G A A C C A A G G G
<b>JN580315.1</b>	G A G G C C C T G T T T C A T T C T A C C C C A A T C A G C C C T A C C A T C C T G T T C G C A C C G G A G G G T T T C A T C C C G A A C C A A G G G

**Tabela 5.** Alinhamento da sequência de aminoácidos de ILTV Brasil/2011/UFMG com as sequências EU104910.1; ILTV JN596963.1; ILTV JN580316.1; JN580315.1

<b>ILTV Brasil/2011/UFMG</b>	SLPPAVPETDR	Y	N	P	LL	P	PCPITPEGPPCPPREEPQQPQEPQEPQSPSFHISEIGEALFHSTP	V	SPTILFAPEGFIPNQG
<b>EU104910.1</b>	SLPPAVPETDR	Y	N	P	LL	P	PCPITPEGPPCPPREEPQQPQEPQEPQSPSFHISEIGEALFHSTP	V	SPTILFAPEGFIPNQG
<b>JN596963.1</b>	SLPPAVPETDR	D	N	P	LL	P	PCPITPEGPPCPPREEPQQPQEPQEPQSPSFHISEIGEALFHSTP	V	SPTILFAPEGFIPNQG
<b>JN580316.1</b>	SLPPAVPETDR	D	N	L	LL	S	PCPITPEGPPCPPREE-----PQEPQSPSFHISEIGEALFHSTP	I	SPTILFAPEGFIPNQG
<b>JN580315.1</b>	SLPPAVPETDR	D	N	L	LL	S	PCPITPEGPPCPPREE-----PQEPQSPSFHISEIGEALFHSTP	I	SPTILFAPEGFIPNQG



## Legenda das figuras

**Figura 5.** Ave de postura. Observa-se a ave com dificuldade respiratória mantendo o bico aberto devido a acúmulo de exsudato na entrada da traqueia. Foto por Bruno Pessamilio.

**Figura 6.** Ave de postura. Observa-se na laringe acúmulo de um material branco-amarelado ocluindo a entrada da traqueia. Foto por Bruno Pessamilio.

**Figura 7.** Laringe e traqueia seccionada longitudinalmente. Observa-se acúmulo de material branco-amarelado depositado sobre a mucosa moderadamente hiperêmica. Laringite e traqueíte fibrino-necrótica aguda intensa.

**Figura 8.** Fotomicrografia de traqueia. Observa-se espessamento difuso e acentuado da mucosa devido a infiltrado linfoplasmocitário. Observa-se também formação de sincícios e desprendimento das células epiteliais de revestimento para o lúmen. 20X. HE.

**Figura 9.** Fotomicrografia de traqueia. Observam-se no lúmen da traqueia restos de células inflamatórias, hemácias e vários sincícios com e sem corpúsculos de inclusão intranucleares. 40X. HE.

**Figura 10.** Fotomicrografia de concha nasal. Observa-se infiltrado linfoplasmocitário na lâmina própria associado a necrose e desprendimento do epitélio de revestimento para o lúmen, juntamente com fibrina. 10X. HE.

**Figura 11.** Fotomicrografia de traqueia. Observa-se que a mucosa se desprende quase completamente e a lâmina própria se encontra exposta. Observa-se também detalhe das células sinciciais formadas a partir de fusão de várias células epiteliais. Os núcleos possuem corpúsculos de inclusão eosinofílicos com um “halo” claro ao redor, denominados corpúsculos Cowdry tipo A. 60X. HE.

**Figura 12.** Fotomicrografia de conjuntiva. Observa-se hiperplasia intensa da mucosa associado a infiltrado linfoplasmocitário e formação e desprendimento de células sinciciais. 20X. HE.

**Figura 13.** Fotomicrografia de traqueia. Observa-se espessamento intenso da mucosa devido a infiltrado linfoplasmocitário na lâmina própria e hiperplasia do epitélio de revestimento. No citoplasma de várias células epiteliais (setas vermelhas), observam-se corpúsculos de inclusão eosinofílicos compatíveis com Boubá aviária e também formação de células sinciciais com corpúsculos de inclusão intranucleares. 20X. HE.

**Figura 14.** Fotomicrografia de traqueia. Observar marcação marrom-amarelada granular no citoplasma das células sinciciais. 60X. IHQ.

**Figura 15.** Fotomicrografia de pulmão. Observar células sinciciais com marcação marrom-amarelada granular no citoplasma. 40X. IHQ.

**Figura 16.** Fotomicrografia de pulmão. Observar marcação marrom-amarelada granular no citoplasma de células epiteliais descamadas. 60X. IHQ.



Figura 5

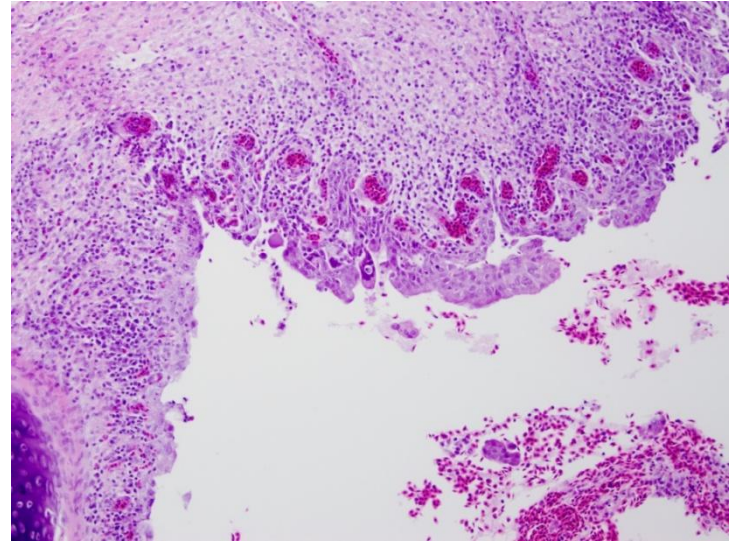


Figura 8



Figura 6

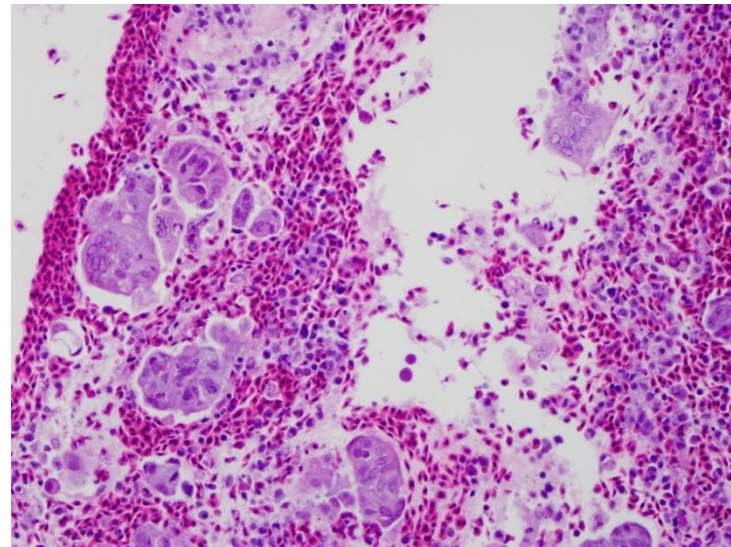


Figura 9



Figura 7

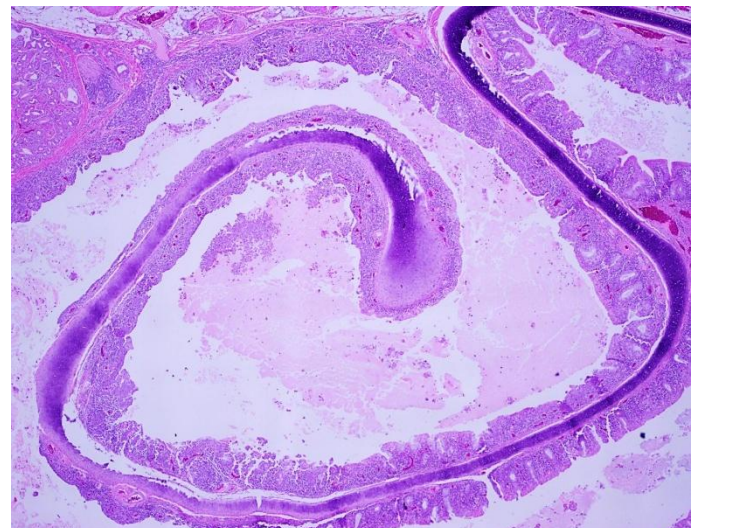


Figura 10



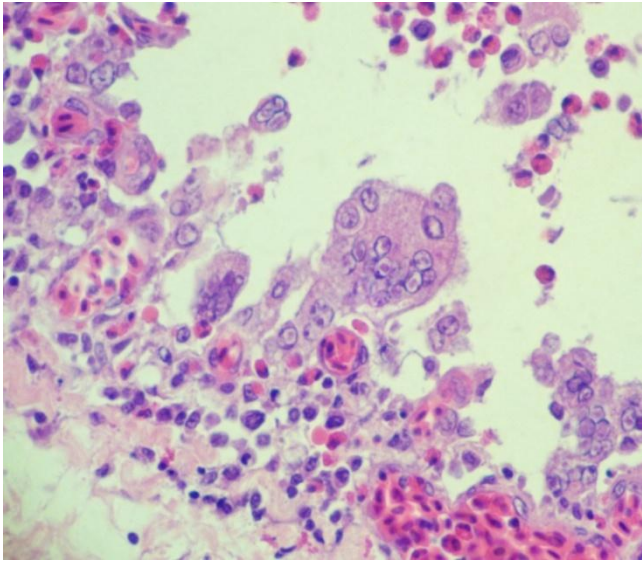


Figura 11

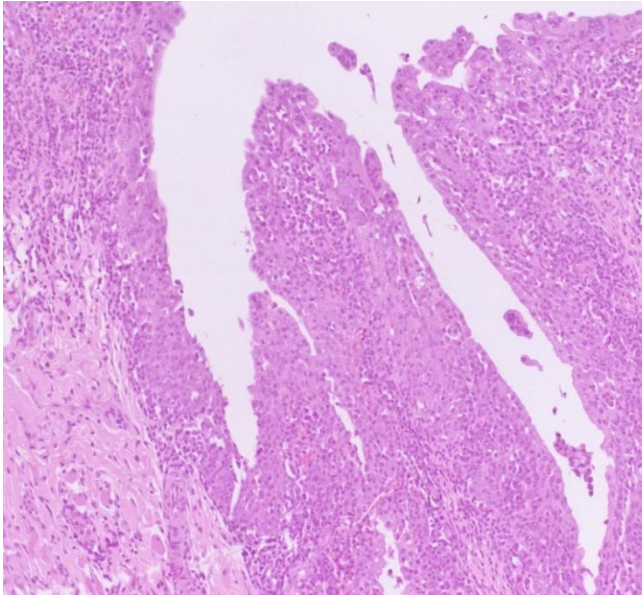


Figura 12

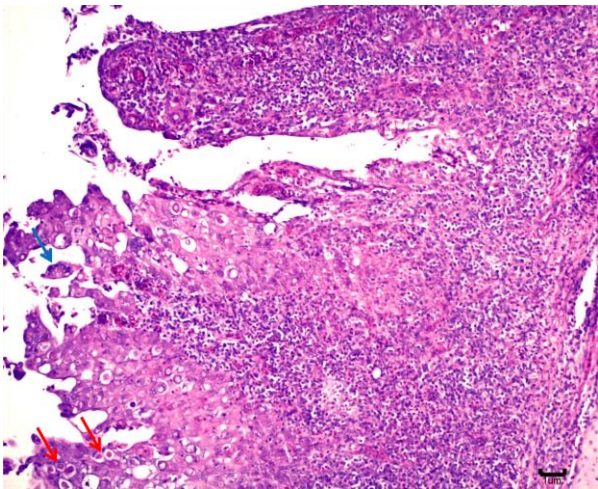


Figura 13

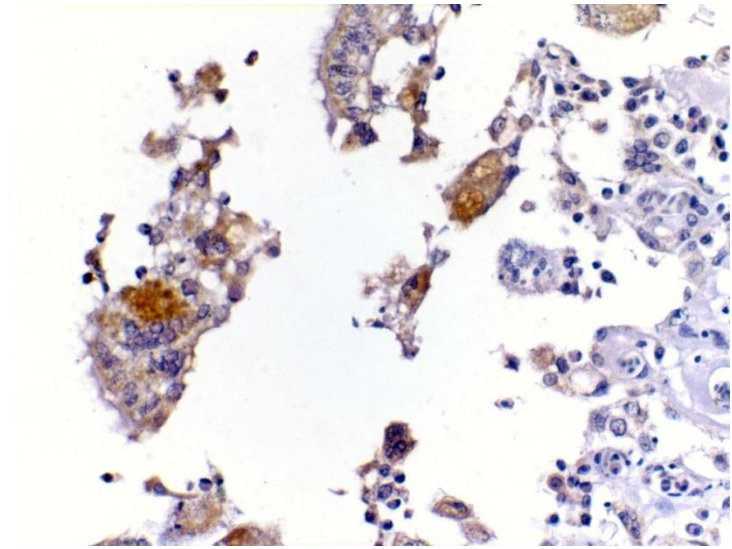


Figura 14

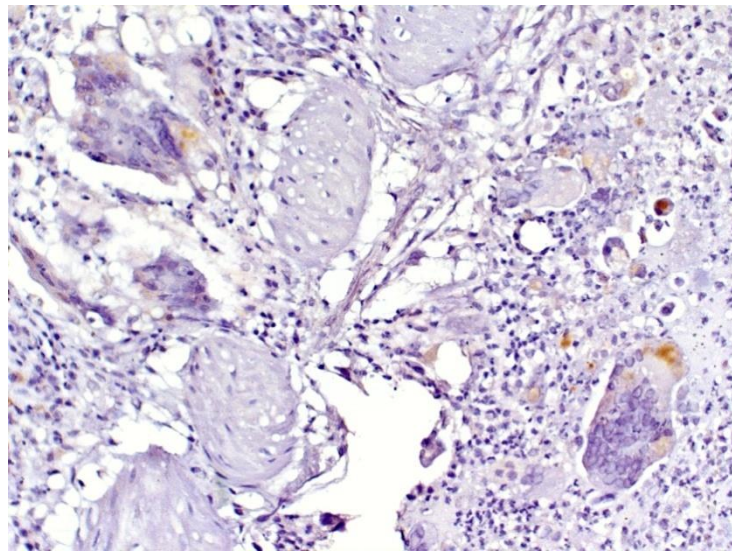


Figura 15

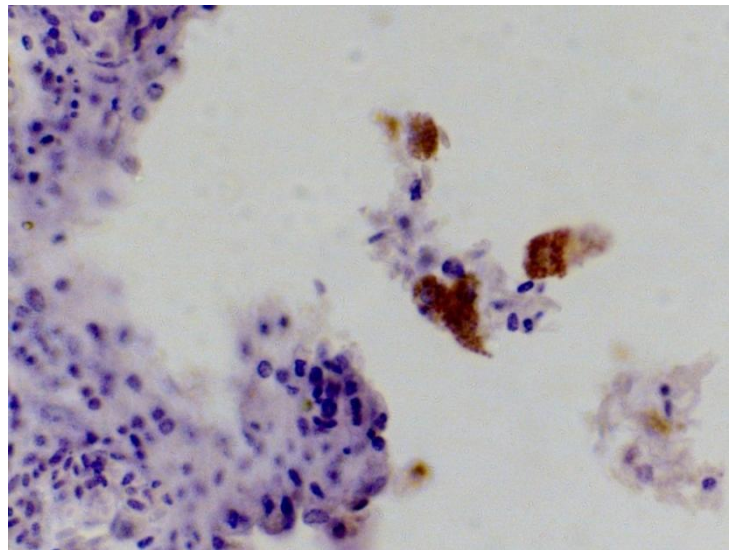


Figura 16

## 6. Discussão

Os sinais clínicos agudos e as lesões observadas nas galinhas de postura comercial de granjas do sul de Minas Gerais foram similares aos relatados para o vírus selvagem da laringotraqueite infecciosa (Guy et al., 1990). As aves que apresentaram intensa dificuldade respiratória e esticavam o pescoço caudodorsalmente estavam na fase subaguda a crônica da doença, com acúmulo de exudato caseoso que ocluía a entrada da laringe. O acúmulo de exsudato na entrada da laringe é a causa principal de morte nos casos de LTI, pois leva a asfixia da ave, tanto na fase aguda quanto na fase crônica da doença (Weaver, 1942). Apesar dos sinais clínicos graves apresentados pelas aves das granjas estudadas, a disseminação da doença nas granjas e a mortalidade (1% a 6%), foi considerada baixa, diferente de outros surtos descritos em poedeiras no Brasil com mortalidade de 10% (Buchala, 2008). A LTI é caracterizada por duas formas clínicas: leve e severa. A forma severa é caracterizada por mortalidade de 5 a 70% e morbidade de 90% a 100% (Bagust et al., 2000 e Guy e Garcia, 2008). A forma leve da LTI é relacionada com estirpes vacinais, especialmente vacinas vivas atenuadas em embrião de galinha (Sellers et al., 2004). No presente estudo, a intensidade das lesões e os sinais clínicos severos sugerem o envolvimento de um vírus de campo ou selvagem.

As lesões macroscópicas caracterizadas principalmente por inflamação fibrinocrótica nas mucosas respiratórias nas aves do presente estudo foram semelhantes às já relatadas (Beach, 1926; May & Tittsler, 1925; Seifried, 1931; Hayashi et al., 1985, Sellers et al., 2004). As alterações foram observadas principalmente no trato respiratório superior e na conjuntiva. Snoeyenbos e Olesiuk (1971) relataram pneumonia e aerossaculite associadas à LTI, e no presente estudo foi

possível observar essas alterações em algumas aves.

A detecção rápida e precoce de aves infectadas pelo GaHV1 é essencial para prevenir e evitar a distribuição da doença (Crespo et al., 2007). No presente estudo, o diagnóstico histopatológico de LTI foi possível em 32 do total de 78 aves. Entretanto, as últimas 30 aves foram coletadas em períodos posteriores ao surto, quando já não eram observados sinais da doença. Os sinais clínicos respiratórios associados a lesões macroscópicas no aparelho respiratório e a observação de necrose associada a células sinciciais com corpúsculo de inclusão intranuclear na histopatologia podem ser utilizados para o diagnóstico da infecção pelo GaHV1. Com base no presente estudo, a avaliação de todos os tecidos respiratórios e a conjuntiva mostrou-se extremamente importante para a obtenção do diagnóstico histopatológico conclusivo. Este é dependente da identificação de células sinciciais com corpúsculos de inclusão intranucleares (Crespo et al., 2007) e a ocorrência destes é variável dependendo da evolução da doença (Hayashi et al., 1985).

Nas aves do surto em questão, inflamação diftérica associada a sincícios contendo corpúsculos de inclusão intranucleares foram observados na conjuntiva e/ou, conchas nasais, seios paranasais, laringe/traqueia e pulmões. Algumas estirpes possuem alta afinidade pela traqueia, causando lesões mais significativas neste tecido. Já outras possuem mais afinidade pela conjuntiva (Kirkpatrick et al., 2006). No presente estudo, observou-se uma afinidade maior do vírus pela traqueia, pois 80% das aves com lesões características de LTI apresentaram lesões na traqueia e também em outros tecidos respiratórios, enquanto que 33% apresentaram lesões na conjuntiva além de outros tecidos respiratórios. Os pulmões também apresentaram alta incidência de lesões características de LTI, assim como as conchas e seios paranasais. As alterações

histológicas características de LTI observadas foram semelhantes às descritas por Purcell (1971) e Hayashi et al. (1985). Nas lesões agudas da traqueia, observaram-se: hiperplasia do epitélio com três ou quatro camadas de células semelhantes a um epitélio estratificado simples e/ou escamoso; formação de células sinciciais contendo numerosos núcleos com corpúsculos de inclusão; infiltrado linfocitário e plasmocitário na lâmina própria e descamação do epitélio de revestimento para o lúmen. Na fase subaguda a crônica da doença, as células sinciciais não foram mais observadas, pois ocorreu descamação do epitélio de revestimento juntamente com essas células. O que se observou neste estágio da doença foi erosão da mucosa com exposição da lâmina própria e em alguns casos associação com exsudato necrotico.

A sequência dos tecidos afetados pelo vírus com lesão característica de LTI foram laringe e traqueia, seguidos pelo pulmão, conchas, seios paranasais e conjuntiva. As lesões encontradas caracterizaram-se pela formação de células sinciciais com corpúsculo de inclusão intranuclear a partir do epitélio hiperplásico dos brônquios primários e secundários. Lesões similares foram observadas por Purcell (1971) três a quatro dias após infecção experimental de aves com GaHV1. No entanto, em outro estudo experimental realizado com estirpe de LTI de baixa virulência inoculada intranasal, as lesões pulmonares e nos sacos aéreos somente ocorreram cinco dias após a inoculação (Timurkaan et al., 2003). De forma similar, nas conchas e nos seios paranasais, sincícios com corpúsculos de inclusão intranucleares foram observados quatro dias após infecção. Porém, diferentemente do que foi descrito por Purcell (1971), que não encontrou nenhuma lesão em conjuntiva, inflamação e formação de sincícios com corpúsculos de inclusão foram observados na conjuntiva de dez galinhas analisadas no presente estudo.

De 3 a 6 dias após a infecção é possível observar alterações características de LTI na histopatologia, pois correspondem à fase aguda da doença. Porém, após esse período, ocorre descamação completa das células sinciciais com corpúsculo de inclusão intranuclear, o que dificulta o diagnóstico de LTI apenas por essa técnica (Hayashi et al., 1985). É importante a coleta e análise dos pulmões, especialmente os brônquios primários e secundários, pois células sinciciais com corpúsculos de inclusão podem ser observadas no lúmen originadas da laringe e traqueia, como foi possível-observar em 10 aves do presente estudo, permitindo o diagnóstico histopatológico.

Os corpúsculos de inclusão dos herpesvírus são acúmulos intranucleares de partículas e proteínas virais. Os corpúsculos primeiramente formados são basofílicos e chamados de Cowdry tipo B e ocupam todo o núcleo. Posteriormente, é formado um “halo” claro ao redor e passam a ser eosinofílicos denominados Cowdry tipo A (Cowdry, 1934).

Estudos utilizando a microscopia eletrônica mostraram que as células sinciciais são formadas pela fusão das células epiteliais ciliadas e não ciliadas da mucosa respiratória (Hayashi et al., 1985). No entanto, o mecanismo pelo qual o vírus induz a formação dos sincícios ainda não foi esclarecida. Possivelmente, a indução da fusão pode ocorrer dirigida pelo próprio GaHV1, levando a interação de glicoproteínas do envelope viral com receptores da membrana das células, semelhantemente ao que ocorre com a infecção em humanos pelo *Measles virus*, garantindo a sua replicação e disseminação (Herschke et al., 2007).

O diagnóstico diferencial da LTI com outras doenças respiratórias deve ser considerado devido a similaridade dos sinais clínicos e das lesões macroscópicas, como coriza infecciosa, boubá avária, doença de Newcastle, micoplasmose por *Mycoplasma gallisepticum*, bronquite



infecciosa, entre outros (Beaudette, 1937). Para isso, além da observação criteriosa das lesões histológicas, deve-se utilizar técnicas complementares de diagnóstico, como detecção do agente.

Lesões no aparelho respiratório sugestivas de outros agentes infecciosos foram observadas em 24 aves incluídas no estudo. Foram encontradas lesões sugestivas de *Mycoplasma gallisepticum* em 15 aves de postura comercial, e em outras duas aves observou-se possível associação deste agente e o GaHV1. *Mycoplasma gallisepticum* é uma bactéria que causa doença respiratória em diversas espécies de aves, principalmente galináceos. Este agente causa sinais clínicos semelhantes às causadas pelo GaHV1, principalmente na fase aguda e o diagnóstico diferencial deve ser feito. Macroscopicamente, pode ser observado espessamento da mucosa, hiperemia e exsudato mucocataral na traqueia (Ley, 2008). Na histopatologia, infecção pelo *M. gallisepticum* tem como característica a hiperplasia de folículos linfóides e o infiltrado linfoplasmocitário formando agregados semelhantes a folículos e o desaparecimento dos cílios, mas sem necrose e desprendimento do epitélio (Gaunson et al., 2000). Estas alterações foram observadas em 17 aves suspeitas. As aves do presente estudo não foram vacinadas para *Mycoplasma gallisepticum*, o que reforça a suspeita sobre esse agente. Contudo, para determinar o diagnóstico definitivo, seria preciso o isolamento do agente ou sua detecção pela PCR.

Outro possível agente envolvido causando sinusite necrotizante em quatro aves é o *Avibacterium paragallinarum*, responsável pela doença respiratória em aves chamada Coriza infecciosa. Essa bactéria causa conjuntivite e sinusite, levando muitas vezes ao aumento de volume dos seios paranasais (Backall, 1999). Nas quatro aves acometidas, havia sinusite necrotizante sugestiva de causa bacteriana, e este agente é o principal

diagnóstico diferencial. Em uma dessas aves, havia lesão característica de LTI associada, sendo provável que a infecção pelo GaHV1 aumentasse a susceptibilidade da ave. Assim como em relação ao *Mycoplasma gallisepticum*, o diagnóstico definitivo só é possível com a detecção do agente por técnicas complementares.

Três aves apresentaram lesões compatíveis com boubia aviária, uma doença causada por um poxvirus que atinge pele, mucosa oral, esôfago e trato respiratório superior. A visualização dos corpúsculos de inclusão eosinofílicos intracitoplasmáticos nas células epiteliais da laringe e traqueia das três aves indica se tratar de uma lesão causada por esse vírus, já que esta é uma alteração característica (Silva et al., 2009). Uma dessas três aves apresentaram co-infecção do poxvirus com o GaHV1, sendo os corpúsculos de inclusão de ambos os agentes presentes nas mesmas células sinciciais. Co-infecção semelhante foi descrita por Tadese et al. (2007), que utilizaram IHQ para diagnóstico de ambos os agentes e observaram marcação positiva para ambos em uma mesma célula epitelial.

Os resultados da técnica de IHQ demonstraram ser esta uma técnica complementar útil para o diagnóstico de LTI, uma vez que se observou marcação positiva para a proteína gJ viral no citoplasma de células aparentemente normais. A vantagem da IHQ sobre a PCR, por exemplo, é a possibilidade de visualização da lesão associada ao agente infeccioso, confirmando a ocorrência da doença e podendo-se verificar a distribuição do vírus no tecido. O anticorpo monoclonal utilizado é específico para a proteína gJ do GaHV1, uma glicoproteína estrutural, codificada pelo gene US5, presente no envelope viral. Esta é uma glicoproteína imunogênica importante na patogenicidade do vírus da LTI, já que a deleção do gene US5 debilita a infecção. Os anticorpos monoclonais específicos para as proteínas gJ e gC são os mais adequados para realização de testes como imuno-

histoquímica e imunofluorescência, já que as aves naturalmente ou experimentalmente infectadas produzem anticorpos contra essas duas proteínas. A análise ultraestrutural do GaHV1 mostrou que os capsídeos virais são formados no núcleo e transportados para o citoplasma onde são envelopados antes de serem liberados do citoplasma (Fuchs et al., 2007). Dessa forma, com a utilização de anticorpos anti glicoproteína gJ, a qual está presente somente no envelope viral, a marcação será visualizada sempre no citoplasma das células epiteliais. No entanto, segundo Fuchs et al. (2007), a glicoproteína gJ não é essencial para a replicação pois sua deleção permitiu a replicação do GaHV1 *in vitro*.

A sensibilidade na histopatologia pode ser baixa devido a descamação das células sinciciais com corpúsculo de inclusão nas fases subaguda a crônica da doença, as quais não são mais visualizadas na histopatologia. Dessa forma, quando não são observadas lesões características de LTI, técnicas complementares de diagnóstico são de extrema importância, como o diagnóstico pela PCR. No presente estudo, a sensibilidade da histopatologia foi menor quando comparada à técnica de PCR nos tecidos de 18 aves. Similarmente, a técnica de imuno-histoquímica pode ter menor sensibilidade que a PCR pois a sensibilidade diminui na ausência de células sinciciais.

A técnica de PCR, utilizando-se o par de *primers* que amplificam um produto de 237 pb, mostrou-se mais sensível que as técnicas de histopatologia e IHQ. Além disso, essa técnica mostrou-se específica para o vírus da LTI, demonstrado pelo resultado de sequenciamento, e as amostras congeladas tiveram resultado idêntico às amostras fixadas em formol e embebidas em parafina. O gene ICP4 (Proteína 4 de Célula Infectada) está presente na região longa (UL) do DNA viral e é formado por 4386 nucleotídeos. Desempenha um papel na regulação da expressão genômica no início da infecção e é usado em estudos

epidemiológicos para distinção entre cepas vacinais e cepas de campo ou selvagens (Johnson et al., 1995; Chacón & Ferreira, 2009). Duas estirpes que apresentaram lesão característica de LTI na laringe e traqueia foram negativas na PCR. Essas estirpes foram também negativas na PCR utilizando-se os *primers* para actina beta, o que demonstra estarem os DNAs dessas amostras inviáveis. O motivo dessa baixa qualidade provavelmente foi o longo período que essas amostras ficaram em solução de formol, já que as amostras foram coletadas por veterinários do MAPA na época do surto em MG e mantidas por vários meses no fixador antes de serem enviadas para o processamento. A fixação em solução de formol por longo período leva a formação de ligações cruzadas entre as biomoléculas presentes no DNA que dificulta a reação em cadeia pela polimerase (Gilbert et al., 2007). Além disso, o processo de inclusão em parafina, usando altas temperaturas, fragmenta o DNA, prejudicando assim a qualidade do material genético. Devido a isso preferiu-se utilizar *primers* com produto de amplificação relativamente pequeno, para que a sensibilidade da técnica de PCR seja maior ao minimizar o efeito desses problemas relacionados a tecidos fixados em formol e embebidos em parafina (Kleter et al., 1998).

O GaHV1, assim como outros herpesvírus, permanece em estado de latência no hospedeiro, podendo ser reativado em situações de estresse e re-excretado para o ambiente. Aves que foram vacinadas com vacinas vivas atenuadas também permanecem como carreadores, já que o vírus vacinal também permanece em latência no hospedeiro e pode ser eliminado para o ambiente (Hughes, 1991). O principal sítio de latência do vírus na ave é o gânglio trigêmio (Williams, 1992). Foram submetidos à técnica de PCR dez gânglios trigêmios de aves de postura comercial, e nove desses foram positivos. Essas aves também foram positivas na laringe e traqueia para o GaHV1. Uma amostra de



gânglio trigêmio de uma ave de subsistência também foi positiva para GaHV1 na PCR; no entanto, a laringe e traqueia dessa ave foram negativas na PCR. Esse resultado sugere que o vírus estava latente no gânglio trigêmio, pois além do PCR negativo para a traqueia, não havia lesão histológica em nenhum tecido analisado desta ave. Similarmente, a laringe e a traqueia de outras duas aves de subsistência foram positivas para o GaHV1 pela PCR na ausência de lesões histológicas. A existência de aves de subsistência com vírus consiste em um fator importante na epidemiologia do vírus, uma vez que essas aves são fonte de contaminação para outras aves e para o ambiente.

No presente estudo, duas estirpes de tecidos fixados em formol e embebidos em parafina e outras duas de suabes traqueais de aves positivas para LTI na PCR foram sequenciadas e alinhadas a duas estirpes vacinais, CEO e TCO, uma cepa Norte Americana e uma Australiana. Chacón & Ferreira (2009) sequenciaram duas regiões do gene ICP4 de sete estirpes de campo em um surto de LTI que ocorreu em São Paulo e alinharam com sequências de várias amostras, inclusive de estirpes vacinais. Assim, pela comparação entre as sequências, foi possível a distinção entre as estirpes que se originaram de vacina (TCO e CEO) e as que não originaram. Da mesma forma Moreno et al. (2010) utilizaram dentre outras técnicas o sequenciamento para verificar correlação genéticas entre as estirpes envolvidas em surto na Itália e estirpes vacinais. No presente estudo, o alinhamento mostrou quatro diferenças em nível de nucleotídeos que resultaram em quatro diferenças em nível de aminoácidos entre as amostras do surto no sul de MG e as estirpes vacinais. Assim, todas as diferenças em nível de nucleotídeo resultaram em diferenças (ou mutações) não-sinônimas, sendo três delas mudanças de aminoácidos de classes diferentes, de acordo com o grupo R. Entre a amostra de MG e a dos EUA (EU104910.1) não houve

diferença. Apesar de a região sequenciada ser muito curta, pode-se sugerir que haja uma certa distância genética entre a estirpe envolvida no surto de LTI no sul de MG e as estirpes vacinais CEO e TCO. Devido também ao pequeno tamanho do fragmento sequenciado e pelas diferentes posições no gene ICP4, não foi possível o alinhamento com outras estirpes brasileiras, inclusive as depositadas por Chacón & Ferreira (2009). Assim, é necessário que se faça um estudo mais aprofundado abrangendo uma região maior do gene ICP4 para determinar a correlação genética entre as estirpes. Além disso, estudos genéticos futuros abrangendo outros genes poderão determinar aspectos da virulência.

## 7. Conclusões

- O surto de LTI ocorrido no sul de Minas Gerais em novembro de 2010 foi caracterizado por sinais clínicos, lesões macroscópicas e histológicas similares ao encontrado na literatura, e caracterizado como de baixa mortalidade.
- O tecido onde se observou maior incidência de lesões características de LTI foi a laringe/traqueia; porém, observou-se também alta incidência de lesões nos pulmões, seguidos por seios nasais e conjuntiva. Assim, todos os tecidos citados são de eleição para o diagnóstico de LTI.
- A IHQ mostrou-se ser uma ferramenta complementar útil no diagnóstico definitivo de LTI utilizando-se anticorpo monoclonal específico para proteína gJ do vírus, especialmente na fase subaguda da doença em que células sinciciais com corpúsculo de inclusão intranucleares não são mais observadas.
- A PCR utilizando-se primers específicos para uma região de 237 pares de bases do gene ICP4 mostrou-se sensível no diagnóstico de LTI, sendo portanto uma importante ferramenta no diagnóstico rápido da doença. A especificidade da reação também foi alta, já que o resultado de sequenciamento mostrou alta

similaridade com outras estirpes de LTI. Assim, recomenda-se fortemente o uso da PCR para diagnóstico da LTI utilizando-se esses *primers* que amplificam uma região pequena do gene ICP4. Dessa forma, essa reação pode ser feita utilizando-se material fixado em formol e embebido em parafina, sendo uma técnica complementar importante à histopatologia. Uma vantagem do uso de material fixado é a possibilidade de realização de estudos retrospectivos da doença.

- O alinhamento da sequência de LTI BRASIL/2011/UFMG (número de acesso KC182579) mostrou mutações não sinônimas quando comparada às sequências das estirpes vacinais TCO e CEO. Devido aos tamanhos reduzidos das sequências analisadas, não foi possível afirmar se há ou não correlação genéticas entre as estirpes. Assim, sequenciamentos futuros de regiões maiores do gene ICP4 devem ser feitos para estudos filogenéticos.

## 8. Referências

- ADAIR, B.M.; TODD, D.; McKILLOP, E.R.; et al. Comparison of serological tests for detection of antibodies to infectious laryngotracheitis virus. *Avian Pathol.*, v. 14, n. 4, p. 461-469, 1985.
- BAGUST, T. J. Laryngotracheitis (Gallid-1) herpesvirus infection in the chicken 4. latency establishment by wild and vaccine strains of ILT virus. *Avian Path.*, v. 15, p. 581-595, 1986.
- BAGUST, T. J.; JONES, R. C.; GUY, J. S. Avian infectious laryngotracheitis. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, v. 19, n. 2, p. 483-492, 2000.
- BEACH, J.R. Infectious bronchitis of fowls. *J Am Vet Med Assoc.*, v. 68, p. 570-580, 1926.
- BEAUDETTE, F.R. Infectious laryngotracheitis. *Poult Sci.*, v. 16, p. 103-105, 1937.
- BELTRÃO, N.; FURIAN, T.Q.; LEÃO, J.A.; et al. Detecção do vírus da laringotraqueíte das galinhas no Brasil. *Pesq. Vet. Bras.* v.24, p.85-88, 2004.
- BLACKALL, P. J. Infectious Coryza: overview of the disease and new diagnostic options. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 12, n. 4, p. 627-632, 1999.
- BOOM, R.; SOL, C.J.; SALIMANS, M.M. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol.*, v. 28, n. 3, p. 495-503, 1990.
- BUCHALA, F.G. Planejamento, implantação e administração de medidas de defesa sanitária animal para o controle laringotraqueíte infecciosa aviária, de 2002 a 2006, região de Bastos, Estado de São Paulo, Brasil. 2008. 157f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Universidade Estadual Paulista, São Paulo.
- BURNET, F.M. Immunological studies with the virus of infectious laryngotracheitis of fowls using the developing egg technique. *J Exp Med.*, v. 63, n. 5, p. 685-701, 1936.
- CHACÓN, J. L.; FERREIRA, A. J. P. Differentiation of field isolates and vaccine strains of infectious laryngotracheitis virus by DNA sequencing. *Vaccine*, v. 27, p. 6731-6738, 2009.
- CHACÓN, J.L.; MIZUMA, M.Y.; FERREIRA, A.J. Characterization by restriction fragment length polymorphism and sequence analysis of field and vaccine strains of infectious laryngotracheitis virus involved in severe outbreaks. *Avian Path.*, v. 36, p.425-433, 2010.
- CHACÓN, J.L.V.; BRANDÃO, P.E.B.; VILRREAL, L.Y.B.; GAMA, N.M.; FERREIRA, A.J.P. Survey of infectious laryngotracheitis outbreak in layer hens and differential diagnosis with other respiratory pathogens. *Brazil. J. Poult. Scie.*, v.9, p.61-67, 2007.
- COVER, M. S.; BENTON, W. J. The Biological Variation of the Infectious Laryngotracheitis Virus. *Avian Dis.*, v. 2, n. 4, p. 375-383, 1958.
- COWDRY, E.V. The problem of intranuclear inclusions in virus diseases. *Arch. Path.*, 18, p. 527-542, 1934.
- CRAWSHAW, G.J.; BOYCOTT, B.R. Infectious laryngotracheitis in peafowl and pheasants. *Avian Dis.*, v. 26, n. 2, p. 397-401, 1982.
- CRESPO, R.; WOOLCOCK, P.R.; CHIN, R.P.; et al. Comparison of diagnostics techniques in an outbreak of infectious laryngotracheitis from meat chickens. *Avian Dis.* v.51, p.858-862, 2007.
- ECCO, R.; BROWN, C.; SUSTA, L.; et al. In vivo transcriptional cytokine responses and association with clinical and pathological outcomes in chickens infected with different Newcastle disease virus isolates using formalin-fixed paraffin-embedded samples. *Vet Immunol Immunopathol.*; v. 15, n. 3, p. 221-229, 2011.
- FITZGERALD, J.E.; HANSON, L.E. A comparison of some properties of laryngotracheitis and herpes simplex viruses. *Am J Vet Res.*, v. 24, p.1297-303, 1963.
- FUCHS, W.; VEITS, J.; HELFERICH, D.; et al. Molecular biology of avian infectious laryngotracheitis virus. *Vet Res.*, v. 38, n. 2, p. 261-79, 2007.

GAUNSON, J. E.; PHILIP, C. J.; WHITHEAR, K. G.; et al. Lymphocytic infiltration in the chicken trachea in response to *Mycoplasma gallisepticum* infection. *Microbiol.*, v. 146, p. 1223-1229, 2000.

GELENCZEI, E.F.; MARTY, E.W. Studies on a tissue-culture modified infectious laryngotracheitis virus. *Avian Dis.*, v. 8, p. 105-122, 1964.

GIAMBRONE, J.J.; FAGBOHUN, O.; MACKLIN, K.S. Management practices to reduce infectious laryngotracheitis virus in poultry litter. *J. Appl. Poult. Res.*, v. 17, p. 64–68, 2008.

GILBERT, M.T.; HASELKORN, T.; BUNCE, M. The isolation of nucleic acids from fixed, paraffin-embedded tissues-which methods are useful when? *PLoS One*, v. 2, n. 6, p. 1-12, 2007.

GRAHAM, R.F.; THROP, J.R.; JAMES, W.A. Subacute or chronic infectious avian laryngotracheitis. *J. Infec. Dis.*, v. 47, p. 87-91, 1931.

GUY, J. S.; BARNES, H. J.; MORGAN, L. M. Virulence of Infectious Laryngotracheitis Viruses: Comparison of Modified-Live Vaccine Viruses and North Carolina Field Isolates. *Avian Dis.*, v. 34, n. 1, p. 106-113, 1990.

GUY, J.S.; BAGUST, J.T. Laryngotracheitis. In *Diseases of Poultry*. SAIF, Y.M.; BARNES, A.; FADLY, J.R. et al. Iowa: Iowa Press, 11th ed, 2003.

GUY, J.S.; GARCIA, M. Laryngotracheitis. In *Diseases of Poultry*. SAIF, Y.M.; FADLY, A.M. et al. Blackwell publishing, 12th ed, 2008.

HAN, M.G.; KIM, S.J. Efficacy of live virus vaccines against infectious laryngotracheitis assessed by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. *Avian Dis.*, v. 47, n. 2, p. 261-271, 2003.

HAYASHI, S.; ODAGIRI, Y.; KOTANI, T.; et al. Pathological changes of tracheal mucosa in chickens infected with infectious laryngotracheitis virus. *Avian Dis.*, v. 29, n. 4, p. 943-950, 1985.

HERSCHKE, F.; PLUMET, S.; DUHEN, T.; et al. Cell-cell fusion induced by measles virus amplifies the type I interferon response. *J. Virol.*, v. 81, n. 23, p. 12859-71, 2007.

HIPÓLITO, O., SOARES, L.A, PEREIRA, O.A.C., PINTO, A.A., BOTTINO, J.A. Isolamento e identificação do vírus da Laringotraqueite infecciosa das galinhas no Brasil. In: Congresso Brasileiro de Microbiologia, 1974, Rio de Janeiro, RJ. Brasil. p. 16.

HUGHES, C. S.; WILLIAMS, R. A.; GASKELL, R. M. Latency and reactivation of infectious laryngotracheitis vaccine virus. *Arch Virol.*, v. 121, p. 213-218, 1991.

HUGHES, C.S.; GASKELL, R.M.; JONES, R.C.; et al. Effects of certain stress factors on the re-excretion of infectious laryngotracheitis virus from latently infected carrier birds. *Res. Vet. Sci.*, v. 46, p. 274-276, 1989.

HUMBERD, J.; GARCÍA, M; RIBLET, S.M.; et al. Detection of infectious laryngotracheitis virus in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues by nested polymerase chain reaction. *Avian Dis.*, v. 46, p. 64-74, 2002.

JOHNSON, D. I.; VAGNOZZI, A.; DOREA, F. Protection Against Infectious Laryngotracheitis by In Ovo Vaccination with Commercially Available Viral Vector Recombinant Vaccines. *Avian dis.*, v. 54, p. 1251–1259, 2010.

JOHNSON, M. A.; PRIDEAUX, C. T.; KONGSUWAN, K.; et al. Gallid herpesvirus 1 (infectious laryngotracheitis virus): cloning and physical maps of the SA-2 strain. *Arch Virol.*, v. 119, p. 181-198, 1991.

JOHNSON, M. A.; TYACK, S. G.; PRIDEAUX, C.; et al. Nucleotide sequence of infectious laryngotracheitis virus (gallid herpesvirus 1) ICP4 gene. *Virus Res.*, v. 35, p. 193-204, 1995.

KERNOHAN, G. Infectious laryngotracheitis in fowls. *J Am Vet Med Assoc.*, v. 78, p. 196-202, 1931.

- KINGSBURY, F. W.; JUNGHER, E. L. Indirect transmission of infectious laryngotracheitis in chickens. *Avian Dis* v. 2, n. 1, p. 54-63, 1958.
- KIRKPATRICK, N. C.; MAHMOUDIAN, A.; COLSON, C. A.; et al. Relationship between mortality, clinical signs and tracheal pathology in infectious laryngotracheitis. *Avian Pathol.*, v. 35, n. 6, p. 449-453, 2006.
- KLETER, B.; DOORN, L. J.; SCHEGGET, J.; et al. Novel Short-Fragment PCR assay for highly sensitive broad-spectrum detection of anogenital human papillomaviruses. *Am J Pathol.*, v. 153, n. 6, p. 1731-1739, 1998.
- LEY, D. H. *Mycoplasma gallisepticum* infection. In: FADLY, A. M.; GLISSON, J. R.; MCDUGALD, L. R.; NOLAN, L. K.; SWAYNE, D. E.; SAIF, Y. M. Diseases of Poultry. Ed. 1. Iowa: Blackwell Publishing, p. 807-867, 2008.
- LINARES, J. A.; BICKFORD, A. A.; COOPER, G. L. et al. An Outbreak of Infectious Laryngotracheitis in California Broilers. *Avian Dis*, v. 38, n. 1, p. 188-192, 1994.
- MAY, H.G.; TITSLER, R.P. Tracheo-laryngotracheitis in poultry. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* v. 67, p. 229-31, 1925.
- MEULEMANS, G.; HALEN, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detecting infectious laryngotracheitis viral antibodies in chicken serum. *Avian Pathol.*, v. 11, n. 3, p. 361-368, 1982.
- MEULEMANS, G.; HALEN, P. Some physico-chemical and biological properties of a Belgian strain (u 76/1035) of infectious laryngotracheitis virus. *Avian pathol.*, v. 7, p. 311-315, 1978.
- MORENO, A; PICCIRILLO, A; MONDIN, A. Epidemic of infectious laryngotracheitis in Italy: characterization of virus isolates by PCR - restriction fragment length polymorphism and sequence analysis. *Avian Dis.*, v. 54, n. 4, p. 1172-7, 2010.
- OLDONI, I; GARCÍA, M. Characterization of infectious laryngotracheitis virus isolates from the United States by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism of multiple genome regions. *Avian Pathol.*, v. 36, n. 2, p. 167-176, 2007.
- OLDONI, I; RODRÍGUEZ-AVILA, A.; RIBLET, S.M.; ZAVALA, G.; GARCÍA, M. Pathogenicity and growth characteristics of selected infectious laryngotracheitis virus strains from the United States. *Avian Pathol.* v. 38, p. 47-53, 2009.
- PORTZ, C., BELTRÃO, N., FURIAN, T, Q. et al. Natural infection of turkeys by infectious laryngotracheitis virus. *Vet Microbiol*, 131, p. 57-64, 2008.
- PULSFORD, M.F. Epidemiology of ILT of poultry. *Aust. Vet. J.*, v. 37, p. 97-99, 1961.
- PURCELL, D. A. Histopathology of infectious laryngotracheitis in fowl infected by an aerosol. *J. Comp. Pathol.*, v. 81, p. 421-431, 1971.
- PURCELL, D.A.; MCFERRAN, J.B. Influence of method of infection on the pathogenesis of infectious laryngotracheitis. *J Comp Pathol.*, v. 79, n. 3, p. 285-91, 1969.
- REYNOLDS, H. A.; WATRACH, A. M.; HANSON, L. E. Development of the Nuclear Inclusion Bodies of Infectious Laryngotracheitis. *Avian Dis.*, v. 12, n. 2, p. 332-347, 1968.
- SAMBERG, Y.; CUPERSTEIN, E.; BENDHEIM, U.; et al. The development of a vaccine against avian infectious laryngotracheitis. IV Immunization of chickens with modified laryngotracheitis vaccine in the drinking water. *Avian Dis.*, v. 15, p. 413-417, 1971.
- SEDDON, H. R.; HART, L. The occurrence of infectious laryngotracheitis in fowls in new south wales. *Aust Vet J.*, v. 11, p. 212-222, 1935.
- SEIFRIED, O. Histopathology of infectious laryngotracheitis In chickens. *J. Exp. Med.*, v. 54, n. 6, p. 817-826, 1931.
- SELLERS, H. S.; GARCÍA, M.; GLISSON, J. R.; et al. Mild Infectious Laryngotracheitis in Broilers in the Southeast. *Avian Dis.*, v. 48, n. 2, p. 430-436, 2004.

- SILVA, P. S.; BATINGA, T. B.; SALES, T. S.; et al. Fowlpox: identification and adoption of prophylactic measures in backyard chickens in Bahia, Brazil. *Braz. J. Poult. Sci.*, v. 11, n. 12, p. 115-119, 2009.
- SNOEYENBOS, G.H.; OLESIUŁ, O. M.; HELMBOLDT, C.F. Isolates of infectious laryngotracheitis which produce pneumonitis and airsacculitis. *Avian Dis.*, v. 16, n. 2, p. 278-84, 1972
- TADESE, T.; POTTER, E.; FITZGERALD, S.; et al. Concurrent Infection in Chickens with Fowlpox Virus and Infectious Laryngotracheitis Virus as Detected by Immunohistochemistry and a Multiplex Polymerase Chain Reaction Technique. *Avian Dis.*, v. 51, p. 719-724, 2007.
- TIMURKAAN, N.; YILMAZ, F.; BULUT, H. et al. Pathological and immunohistochemical findings in broilers inoculated with a low virulent strain of infectious laryngotracheitis virus. *J. Vet. Sci.*, v. 4, n. 2, p. 175-180, 2003.
- VILLARREAL, L.Y.B.; BRANDÃO, P.E.B.; CHACÓN, J.L.V.; et al. Detection and molecular characterization of infectious laryngotracheitis virus in laying hens in Brazil. *Rev. Bras. Cienc. Avic.*, v. 6, n. 4, 2004.
- WATRACH, A. M.; HANSON, L. E.; WATRACH, M. A. The Structure of infectious laryngotracheitis virus. *Virology*, v. 21, p. 601-608, 1963.
- WEAVER, C. H. Infectious Laryngotracheitis: Its Diagnosis and Control. *Comparative Medicine*, V. 5, N. 4, p. 107-115, 1942.
- WILLIAMS, R. A., BENNETT, M., BRADBURY, J. M. Demonstration of sites of latency of infectious laryngotracheitis virus using the polymerase chain reaction. *J. Gen.Virol.* v. 73, p. 2415-2420, 1992.
- WINTERFIELD, R.W.; SO, I.G. Susceptibility of turkeys to infectious laryngotracheitis. *Avian Dis.*, v. 12, n. 1, p. 191-202, 1968.
- YORK, J. J.; SONZA, S.; FAHEY, K. J. Immunogenic Glycoproteins of Infectious Laryngotracheitis Herpesvirus. *Virology*, v. 161, n. 2, p. 340-347, 1987.

**Anexo 1. Distribuição do vírus da LTI na conjuntiva e nos tecidos respiratórios identificados pela IHQ e PCR**

Identificação	Conjuntiva		Laringe/traqueia		Conchas e seios nasais		Pulmão		Gânglio trigêmio	
	IHQ	PCR	IHQ	PCR	IHQ	PCR	IHQ	PCR	IHQ	PCR
1	-	-	+	+	NR	+	NR	+	NR	NR
2	NR	-	+	-	-	-	-	+	NR	NR
3	NR	-	NR	+	NR	-	NR	+	NR	NR
4	-	-	+	+	-	-	+	-	NR	NR
5	NR	-	+	-	-	-	+	-	NR	NR
6	-	+	+	+	-	-	-	-	NR	NR
7	NR	+	-	+	-	+	+	+	NR	NR
8	-	-	-	-	-	-	-	-	NR	NR
9	-	-	-	-	+	-	-	-	NR	NR
10	NR	+	NR	+	NR	+	NR	+	NR	NR
11	NR	NR	NR	+	NR	-	NR	+	NR	NR
12	-	-	+	+	-	+	-	+	NR	NR
13	NR	+	NR	+	NR	+	NR	+	NR	NR
14	NR	-	NR	-	NR	NR	NR	-	NR	NR
16	NR	-	+	-	-	-	-	-	NR	NR
17	-	-	+	-	-	-	-	-	NR	NR
18	NR	-	NR	+	NR	-	NR	-	NR	NR
19	NR	NR	+	+	-	+	NR	+	NR	NR
20	-	+	+	+	-	+	+	+	NR	+
21	NR	+	+	+	+	+	+	+	NR	+
22	NR	+	NR	+	NR	+	NR	+	NR	NR
23	NR	+	-	+	-	+	+	+	NR	NR
24	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	NR

25	NR	-	NR	+	NR	-	NR	-	NR	NR
26	NR	-	NR	+	NR	-	NR	-	NR	NR
27	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	NR
28	NR	+	NR	+	NR	-	NR	-	NR	NR
29	-	-	+	+	-	-	+	+	<b>NR</b>	+
30	NR	-	NR	+	NR	-	NR	-	NR	NR
31	NR	+	-	+	NR	-	NR	-	NR	NR
32	-	+	+	+	+	+	+	+	NR	NR
33	NR	+	NR	+	NR	+	NR	-	NR	NR
34	-	+	NR	+	+	+	-	-	NR	NR
35	NR	+	NR	-	NR	-	NR	-	NR	NR
36	NR	+	NR	+	NR	+	NR	+	NR	NR
37	NR	-	NR	+	NR	+	NR	+	NR	NR
38	-	+	+	+	-	-	-	+	NR	-
39	NR	+	NR	+	NR	+	NR	+	NR	+
40	NR	+	NR	-	NR	-	NR	+	NR	+
41	-	+	+	+	+	+	-	+	NR	+
42	NR	+	-	-	NR	+	NR	+	NR	NR
43	-	+	+	+	-	+	+	+	NR	NR
44	-	+	-	-	-	-	+	+	NR	NR
45	-	+	+	+	+	+	+	-	NR	NR
46	+	+	+	+	+	+	+	-	NR	NR
47	NR	+	+	+	-	-	NR	+	NR	NR
48	-	+	-	+	-	+	-	+	NR	+
49	-	+	+	+	-	+	-	+	NR	NR
50	-	+	+	+	NR	+	+	+	NR	NR
51	NR	+	NR	-	NR	+	NR	+	NR	NR



52	NR		NR	NR	NR		NR	+	NR	NR
53	NR	+	-	+	+	+	+	+	NR	+
54	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
55	NR	-	NR	-	NR	-	NR	NR	NR	NR
56	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	-	<b>NR</b>	<b>NR</b>
57	NR	NR	NR	-	NR	-	NR	-	NR	NR
58	NR	NR	NR	-	NR	-	NR	-	NR	NR
59	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
60	NR	NR	NR	-	NR	NR	NR	NR	NR	NR
61	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
62	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	-	NR	NR
63	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
64	NR	-	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
65	NR	-	NR	-	NR	NR	NR	-	NR	NR
66	NR	NR	NR	-	NR	-	NR	NR	NR	NR
67	NR	NR	NR	NR	NR	-	NR	NR	NR	NR
68	NR	NR	NR	-	NR	+	NR	NR	NR	NR
69	NR	-	NR	NR	NR	-	NR	NR	NR	NR
70	NR	NR	NR	+	NR	NR	NR	-	NR	NR
71	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
72	NR	NR	NR	+	NR	-	NR	NR	NR	NR
73	NR	NR	NR	-	NR	NR	NR	NR	NR	NR
74	NR	NR	NR	-	NR	+	NR	-	NR	NR
75	NR	NR	NR	-	NR	+	NR	NR	NR	NR
76	NR	NR	NR	-	NR	NR	NR	NR	NR	NR
77	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
78	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR

## Anexo 2. Lesões histológicas observadas nos tecidos respiratórios e na conjuntiva das aves de postura comercial

Amostra	Tecido	Infiltrado linfoplasmocitário difuso e/ou linfocelular	Necrose epitelial com infiltrado linfoplasmocitário	Necrose epitelial com infiltrado linfoplasmocitário e células sinciciais	Necrose epitelial com infiltrado linfoplasmocitário e células sinciciais com corpúsculo de inclusão
1	Conjuntiva	+			
	Laringe/traqueia				+++
	Conchas /seios nasais	+			
	Pulmão	+			
2	Conjuntiva	Sem alterações			
	Laringe/traqueia		++		
	Conchas /seios nasais		+++		
	Pulmão	+++			
3	Conjuntiva	+			
	Laringe/traqueia	+			
	Conchas /seios nasais	+			
	Pulmão	Sem alterações			
4	Conjuntiva	++			
	Laringe/traqueia			+++	
	Conchas /seios nasais	++			
	Pulmão	+++			
5	Conjuntiva	Sem alterações			
	Laringe/traqueia	++			
	Conchas /seios nasais	+			
	Pulmão	+			
6	Conjuntiva	Sem alterações			
	Laringe/traqueia		+++		

	Conchas /seios nasais	+			
	Pulmão		Sem alterações		
7	Conjuntiva				++
	Laringe/traqueia	+			
	Conchas /seios nasais				++
	Pulmão		Sem alterações		
8	Conjuntiva		Sem alterações		
	Laringe/traqueia		+++		
	Conchas /seios nasais			++	
	Pulmão		+++		
9	Conjuntiva	+++			
	Laringe/traqueia	+++			
	Conchas /seios nasais		+++		
	Pulmão	+			
10	Conjuntiva	++			
	Laringe/traqueia	+++			
	Conchas /seios nasais		+++		
	Pulmão	+			
11	Conjuntiva		+++		
	Laringe/traqueia	+++			
	Conchas /seios nasais		+++		
	Pulmão	+			
12	Conjuntiva		Sem alterações		
	Laringe/traqueia				+++
	Conchas /seios nasais	++			
	Pulmão		Sem alterações		
	Conjuntiva	++			

13	Laringe/traqueia		+++		
	Conchas /seios nasais	Tecido autolisado			
	Pulmão	+++			
14	Conjuntiva	Sem alterações			
	Laringe/traqueia			+++	
	Conchas /seios nasais	Tecido não foi coletado			
	Pulmão		+++		
15	Conjuntiva	Tecido autolisado			
	Laringe/traqueia	Tecido autolisado			
	Conchas /seios nasais	Tecido autolisado			
	Pulmão	Tecido autolisado			
16	Conjuntiva	++			
	Laringe/traqueia				+++
	Conchas /seios nasais	++			
	Pulmão	++			
17	Conjuntiva	++			
	Laringe/traqueia				+++
	Conchas /seios nasais				++
	Pulmão				++
18	Conjuntiva	Sem alterações			
	Laringe/traqueia				++
	Conchas /seios nasais			++	
	Pulmão				+
19	Conjuntiva	Tecido não foi coletado			
	Laringe/traqueia			+++	
	Conchas /seios nasais				+++
	Pulmão	Tecido autolisado			

20	Conjuntiva	+			
	Laringe/traqueia				+++
	Conchas /seios nasais		+++		
	Pulmão				+++
21	Conjuntiva	+			
	Laringe/traqueia				++
	Conchas /seios nasais	Sem alterações			
	Pulmão	+			
22	Conjuntiva				+++
	Laringe/traqueia				+++
	Conchas /seios nasais		+++		
	Pulmão				+++
23	Conjuntiva				
	Laringe/traqueia				+++
	Conchas /seios nasais		++		
	Pulmão				+++
24	Conjuntiva	++			
	Laringe/traqueia	++			
	Conchas /seios nasais	++			
	Pulmão	++			
25	Conjuntiva	++			
	Laringe/traqueia	++			
	Conchas /seios nasais	++			
	Pulmão	+++			
26	Conjuntiva	++			
	Laringe/traqueia	++			
	Conchas /seios nasais	++			
	Pulmão	++			

27	Conjuntiva	++			
	Laringe/traqueia	++			
	Conchas /seios nasais	+++			
	Pulmão	++			
28	Conjuntiva	++			
	Laringe/traqueia	+++			
	Conchas /seios nasais	+++			
	Pulmão	+++			
29	Conjuntiva	+			
	Laringe/traqueia		++		
	Conchas /seios nasais	++			
	Pulmão				+++
30	Conjuntiva	+			
	Laringe/traqueia	+++			
	Conchas /seios nasais	+++			
	Pulmão				+++
31	Conjuntiva	++			
	Laringe/traqueia	+++			
	Conchas /seios nasais		+++		
	Pulmão			+++	
32	Conjuntiva				+++
	Laringe/traqueia				+++
	Conchas /seios nasais		+++		
	Pulmão				+++
33	Conjuntiva	++			
	Laringe/traqueia	++			
	Conchas /seios nasais	++			
	Pulmão			+++	

34	Conjuntiva	++			
	Laringe/traqueia			++	
	Conchas /seios nasais	++			
	Pulmão			+++	
35	Conjuntiva	+			
	Laringe/traqueia	+++			
	Conchas /seios nasais	+++			
	Pulmão	+++			
36	Conjuntiva				+++
	Laringe/traqueia				+++
	Conchas /seios nasais			++	
	Pulmão				+++
37	Conjuntiva	+++			
	Laringe/traqueia				+++
	Conchas /seios nasais	++			
	Pulmão				++
38	Conjuntiva	++			
	Laringe/traqueia				+++
	Conchas /seios nasais				+
	Pulmão				+++
39	Conjuntiva				+++
	Laringe/traqueia		+++		
	Conchas /seios nasais				+++
	Pulmão				+++
40	Conjuntiva				+
	Laringe/traqueia				+++
	Conchas /seios nasais		+		
	Pulmão				+++

41	Conjuntiva				+++	
	Laringe/traqueia				+++	
	Conchas /seios nasais				++	
	Pulmão	++				
42	Conjuntiva				+++	
	Laringe/traqueia				+++	
	Conchas /seios nasais				++	
	Pulmão			++		
43	Conjuntiva	Sem alterações				
	Laringe/traqueia				+++	
	Conchas /seios nasais				++	
	Pulmão				++	
44	Conjuntiva	++				
	Laringe/traqueia				++	
	Conchas /seios nasais	+				
	Pulmão		++			
45	Conjuntiva	++				
	Laringe/traqueia				+++	
	Conchas /seios nasais				++	
	Pulmão				++	
46	Conjuntiva				+++	
	Laringe/traqueia				+++	
	Conchas /seios nasais				++	
	Pulmão		++			
47	Conjuntiva	+				
	Laringe/traqueia				++	
	Conchas /seios nasais		++			



	Pulmão				++
48	Conjuntiva	+			
	Laringe/traqueia				++
	Conchas /seios nasais				++
	Pulmão				++
49	Conjuntiva	Sem alterações			
	Laringe/traqueia				++
	Conchas /seios nasais				++
	Pulmão				++
50	Conjuntiva	++			
	Laringe/traqueia				++
	Conchas /seios nasais				+++
	Pulmão	Sem alterações			
51	Conjuntiva				++
	Laringe/traqueia				+++
	Conchas /seios nasais				+++
	Pulmão				++
52	Conjuntiva	Tecido não foi coletado			
	Laringe/traqueia	Tecido não foi coletado			
	Conchas /seios nasais	Tecido não foi coletado			
	Pulmão				++
53	Conjuntiva				
	Laringe/traqueia			++	
	Conchas /seios nasais				++
	Pulmão			+++	
54	Conjuntiva	Sem alterações			
	Laringe/traqueia	+++			
	Conchas /seios nasais	Sem alterações			

	Pulmão	++			
55	Conjuntiva		+++		
	Laringe/traqueia	+++			
	Conchas /seios nasais	++			
	Pulmão	+++			
56	Conjuntiva	++			
	Laringe/traqueia	++			
	Conchas /seios nasais	++			
	Pulmão	++			
57	Conjuntiva	Sem alterações			
	Laringe/traqueia	++			
	Conchas /seios nasais	+			
	Pulmão	+			
58	Conjuntiva	++			
	Laringe/traqueia	++			
	Conchas /seios nasais	Sem alterações			
	Pulmão	++			
59	Conjuntiva	+			
	Laringe/traqueia	+			
	Conchas /seios nasais	Sem alterações			
	Pulmão	+++			
60	Conjuntiva	Sem alterações			
	Laringe/traqueia	++			
	Conchas /seios nasais	++			
	Pulmão	+++			
61	Conjuntiva	Sem alterações			
	Laringe/traqueia	++			
	Conchas /seios nasais	++			

	Pulmão		Sem alterações		
62	Conjuntiva		Sem alterações		
	Laringe/traqueia	+++			
	Conchas /seios nasais	+++			
	Pulmão	+++			
63	Conjuntiva		Sem alterações		
	Laringe/traqueia	+			
	Conchas /seios nasais	++			
	Pulmão	+			
64	Conjuntiva		Sem alterações		
	Laringe/traqueia	++			
	Conchas /seios nasais	+++			
	Pulmão	+++			
65	Conjuntiva		Sem alterações		
	Laringe/traqueia	++			
	Conchas /seios nasais	++			
	Pulmão		Sem alterações		
66	Conjuntiva	++			
	Laringe/traqueia	+			
	Conchas /seios nasais	+			
	Pulmão	+			
67	Conjuntiva	+			
	Laringe/traqueia	+++			
	Conchas /seios nasais		Sem alterações		
	Pulmão	++			
68	Conjuntiva	++			
	Laringe/traqueia	++			
	Conchas /seios nasais	++			

	Pulmão		Sem alterações		
69	Conjuntiva	++			
	Laringe/traqueia	++			
	Conchas /seios nasais	+			
	Pulmão	++			
70	Conjuntiva		Sem alterações		
	Laringe/traqueia	++			
	Conchas /seios nasais	++			
	Pulmão	+++			
71	Conjuntiva	++			
	Laringe/traqueia	+			
	Conchas /seios nasais		+++		
	Pulmão	+			
72	Conjuntiva		Sem alterações		
	Laringe/traqueia	++			
	Conchas /seios nasais	+			
	Pulmão	++			
73	Conjuntiva	++			
	Laringe/traqueia	+			
	Conchas /seios nasais		Sem alterações		
	Pulmão		Sem alterações		
74	Conjuntiva		Sem alterações		
	Laringe/traqueia	++			
	Conchas /seios nasais	++			
	Pulmão		Tecido autolisado		
75	Conjuntiva		Sem alterações		
	Laringe/traqueia	+			
	Conchas /seios nasais	+			

	Pulmão	+				
76	Conjuntiva		Sem alterações			
	Laringe/traqueia	+				
	Conchas /seios nasais	+				
	Pulmão		Sem alterações			
77	Conjuntiva		Sem alterações			
	Laringe/traqueia	+				
	Conchas /seios nasais		Sem alterações			
	Pulmão	++				
78	Conjuntiva	+				
	Laringe/traqueia	++				
	Conchas /seios nasais	+				
	Pulmão	+++				

+ lesão leve ++ lesão moderada +++ lesão acentuada

### **Anexo 3. Questionário epidemiológico para aves de postura**

Nome da propriedade: \_\_\_\_\_

Nome do proprietário: \_\_\_\_\_

Endereço e telefone:

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Veterinário responsável: \_\_\_\_\_

Endereço e telefone:

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

1- Qual é o número total de aves? \_\_\_\_\_

2- Em quantos galpões a granja é dividida? \_\_\_\_\_

3- Qual o número de aves em cada galpão? \_\_\_\_\_

4- Quais as idades em que as aves são divididas? \_\_\_\_\_

5- Quais sinais clínicos foram observados e quando foram inicialmente observados? \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

6- Há predominância no aparecimento dos sinais clínicos em relação a idade? \_\_\_\_\_

7- Quantas aves doentes? \_\_\_\_\_

8- Quantas aves doentes morreram? \_\_\_\_\_

9- Quais vacinações são feitas na granja? \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

10- Foi usado algum tipo de medicamento? Sim\_\_\_ Não\_\_\_ Quais? \_\_\_\_\_

11- Outras aves tem acesso à granja? Sim\_\_\_ Não\_\_\_

12- Há algum funcionário que possui aves de fundo de quintal? Sim\_\_\_ Não\_\_\_  
Total de aves \_\_\_\_\_ Confinadas? \_\_\_\_\_ Alimentação \_\_\_\_\_

13- Foi observada alguma alteração na taxa de postura? Diminuiu\_\_\_ Aumentou\_\_\_  
Não houve alteração\_\_\_

14- Foi observada alguma anormalidade nos ovos? \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

15- Qual a conduta em relação às aves mortas? \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

16- Qual a conduta em relação às aves doentes? \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Alterações macroscópicas:

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL  
- C E T E A -

**CERTIFICADO**

Certificamos que o **Protocolo nº 204/2011**, relativo ao projeto intitulado "**Estudo da ocorrência e distribuição geográfica da laringotraqueíte infecciosa em aves comerciais e de subsistência naturalmente infectadas no estado de Minas Gerais**", que tem como responsável(is) **Roselene Ecco**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **19/ 10/2011**.

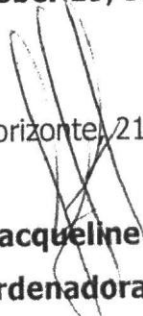
Este certificado expira-se em **19/ 10/ 2016**.

**CERTIFICATE**

We hereby certify that the **Protocol nº 204/2011**, related to the project entitled "**Study of the occurrence and geographical distribution of infectious laryngotracheitis in commercial and backyard chickens naturally infected in the Minas Gerais**", under the supervisors of **Roselene Ecco**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **October 19, 2011**.

This certificate expires in **October 19, 2016**.

Belo Horizonte, 21 de Outubro de 2011.

  
**Profª. Jacqueline Isaura Alvarez-Leite**  
**Coordenadora do CETEA/UFMG**

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