

**RODRIGO DE MACEDO COUTO**

**CARACTERIZAÇÃO PATOLÓGICA E MOLECULAR DO VÍRUS DA  
LARINGOTRAQUEÍTE INFECCIOSA E DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL EM  
AVES COMERCIAIS NO ESTADO 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**

**UFMG - Escola de Veterinária**

**2014**

C871c Couto, Rodrigo de Macedo, 1987-  
Caracterização patológica e molecular do vírus da laringotraqueíte infecciosa e diagnóstico diferencial em aves comerciais no Estado de Minas Gerais / Rodrigo de Macedo Couto. – 2014.

102 p. : il.

Orientadora: Roselene Ecco

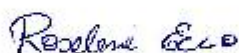
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária.

Inclui bibliografia

I. 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.

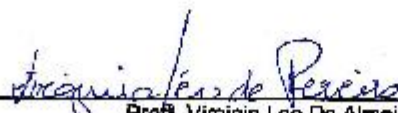
CDD – 636.508 966

Dissertação defendida e aprovada em 25 de fevereiro de 2014, pela Comissão Examinadora constituída por:



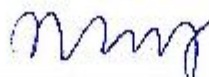
---

Prof. Roselane Ecco  
Presidente - Orientador



---

Prof. Virginia Leo De Almeida Pereira<sup>2ª</sup>  
Universidade Federal Fluminense



---

Prof. Nelson Rodrigo da Silva Marliño  
Escola de Veterinária - UFMG



## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus, que me iluminou e me proporcionou mais esta oportunidade.

Agradeço em especial a meus pais, Maria Lúcia e Nilo Sérgio que contribuíram para a formação de meu caráter, pela amizade, apoio e amor acima de tudo.

À minha irmã, Natália, pela amizade fraterna e eterna que me proporciona.

À minhas avós Maria Aparecida e Doralice (em memória) que me aconselharam com sabedoria nos momentos mais difíceis.

À minha tia Alice, e minha Prima Cristina pela alegria que transmitem nos momentos em que estão presentes.

À minha gata, Misty, pelos momentos de alegria e a amizade sincera.

À minha amiga irmã Pâmela Valente, minha companheira desde da graduação, assim como no mestrado.

Às minhas novas irmãs, Giselle Luckashevich e Gilvanni Brito, que dividiram seu espaço comigo durante esses anos.

Aos meus amigos do ensino fundamental Caroline Franco, Gabriela Assis, Pedro Lucena, Orlando Vinicius e Tatiana Di Blasi que acompanharam minha trajetória desde o início.

Aos meus amigos cariocas que sempre estiveram presentes apesar da distância, Hugo Azevedo, Geovanni Riccioni, Felipe Brum, Gabriel Joia, Vladimir Maiques, Hugo Libonati, Bruno Soares, Marion Pereira, Erich Telleria, Ana Carolina Trindade, Marina Lourenço, Renata Arcoverde, Elton Ribeiro, Fausto Saito e Juliana Rocha, que estiveram sempre presentes me ouvindo e me aconselhando.

Aos novos amigos que fiz em Belo Horizonte, Vinícius Coelho, Maycon Martins, Gilberto Biet, Daniel Vasconcelos, Eliton Botelho, Leandro Pinheiro, Leon Carneiro, Derick Henrique, Henrique Marra, Lucas Sacramento, Ulisses Pereira, Alcimar Melo e Vinícius Morais, pelos momentos de descontração e baladas, sem eles teria sido impossível.

Aos meus irmãos científicos Juliana Braga, Isabella Avelar, Ingrid Preis, Aparecida Tatiana, Camila Costa, Matheus Vilardo.

Aos amigos da patologia que proporcionaram momentos incríveis, e tornaram as aulas muito mais divertidas, Lorena Gabriela, José Sato, Juneo Freitas, Amanda Gabriele, Andreia Turchetti, Carlos Eduardo, Talita Resende, Laís Bittencourt, Michelle Gabardo e Ana Patrícia Carvalho.

Aos profs. da patologia veterinária Rogéria Serakides, Natália Ocarino, Roberto Guedes e Renato Lima que muito contribuíram para meu aprendizado em patologia.

Às técnicas de laboratório Natália e Leimar, pela paciência e por tornarem os momentos no laboratório descontraídos.

Aos veterinários do IMA, Isabela Hergot, Simone, Luiz Antônio e Laura, pela colaboração com o trabalho.

Aos profs. Nelson Rodrigo e Maurício Resende, e a pós doutoranda Sandra Yuliet, que sempre estiveram dispostos a ajudar.

A Bruno Brasil, Marcela Drummond e Danielle por terem compartilhado seus conhecimentos comigo.

À minha orientadora Roselene Ecco, por ter compartilhado sua experiência, e que sem sua ajuda, sem dúvida alguma não teria chegado a conclusão desta dissertação.

A todos os professores da UFMG que muito contribuíram para meu crescimento profissional.

---

## SUMÁRIO

---

<b>RESUMO</b> .....	13
<b>ABSTRACT</b> .....	14
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	16
2.1 Etiologia.....	16
2.2 Epidemiologia.....	16
2.3 Infecção e patogenia.....	17
2.4 Sinais clínicos.....	17
2.5 Lesões macroscópicas.....	18
2.6 Lesões histológicas.....	18
2.7 Diagnóstico.....	18
2.8 Controle.....	19
2.8.1 Biossegurança.....	19
2.8.2 Vacinação.....	19
2.8.2.1 Vias de administração e reação pós vacinal.....	20
2.8.2.2 Reversão da virulência.....	20
2.8.2.3 Vacinas vectoradas.....	21
2.9 Diagnóstico diferencial.....	21
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	22
3.1 Objetivos gerais.....	22
3.2 Objetivos específicos.....	23
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	23
4.1 Histórico.....	23
4.2 Localização das granjas.....	24

4.3	Coleta das amostras, aviação dos sinais clínicos e necropsia.....	26
4.4	Histopatologia.....	27
4.5	Extração de DNA.....	28
4.6	Reação em cadeia pela polimerase (PCR).....	28
4.7	Sequenciamento de DNA.....	29
4.7.1	Vírus da laringotraqueite infecciosa (GaHV-1).....	29
4.7.2	<i>Mycoplasma gallisepticum</i> .....	31
4.8	Número de acesso das sequências de nucleotídeos.....	32
4.8.1	Vírus da laringotraqueite infecciosa.....	32
4.8.2	<i>Mycoplasma gallisepticum</i> .....	33
4.9	Estudo epidemiológico.....	33
4.10	Análise estatística.....	33
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>33</b>
5.1	Epidemiologia.....	33
5.2	Sinais clínicos.....	36
5.3	Lesões macroscópicas.....	36
5.4	Histopatologia.....	37
5.4.1	Laringotraqueite infecciosa aviária.....	37
5.4.2	Diagnóstico diferencial.....	41
5.5	Codornas.....	44
5.6	Reação em cadeia pela polimerase (PCR).....	44
5.6.1	Laringotraqueite infecciosa aviária.....	44
5.6.2	Diagnóstico diferencial.....	46
5.6.3	Codornas.....	47



5.7 Sequenciamento.....	47
5.7.1 Laringotraqueíte infecciosa aviária.....	47
5.7.1.1 Gene ICP4.....	47
5.7.1.2 Gene TK.....	54
5.7.2 Diagnóstico diferencial ( <i>Mycoplasma gallisepticum</i> ).....	59
5.7.2.1 IGSR.....	59
5.7.2.2 <i>mgc2</i> .....	62
5.8 Análise das aves vacinadas e não vacinadas com as vacinas vetorizadas para LTI.....	67
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>68</b>
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>75</b>
<b>8. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>76</b>

---

### LISTA DE TABELAS

---

<b>Tabela 1:</b> Quantitativo das amostras utilizadas no estudo e respectivas datas das coletas.....	27
<b>Tabela 2:</b> Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para PCR dos diferentes patógenos respiratórios: GaHV-1, <i>Mycoplasma gallisepticum</i> e <i>Mycoplasma synoviae</i> .....	29
<b>Tabela 3:</b> Sequências dos oligonucleotídeos utilizados para sequenciamento dos gene ICP4 e TK do GaHV-1.....	30
<b>Tabela 4:</b> Sequências dos oligonucleotídeos utilizados para sequenciamento dos gene IGSR e <i>mgc2</i> do <i>Mycoplasma gallisepticum</i> .....	32
<b>Tabela 5:</b> Esquema de vacinação granja 1.....	35
<b>Tabela 6:</b> Esquema de vacinação granja 2.....	36
<b>Tabela 7:</b> Número de aves positivas para o GaHV-1, <i>M. gallisepticum</i> e <i>M. synoviae</i> das 117 aves avaliadas em 2012.....	47
<b>Tabela 8:</b> Número de aves positivas para o GaHV-1, <i>M. gallisepticum</i> e <i>M. synoviae</i> das	

42 aves avaliadas em 2013.....	47
<b>Tabela 9:</b> Comparações das sequências de nucleotídeos do gene ICP4 fragmento 1 de amostras de Minas Gerais, estirpes vacinais e outras estirpes do GaHV-1 publicadas no <i>genbank</i> . As posições 539 e 626 apresentam as mutações exclusivas observadas nas sequências obtidas, onde houve a substituição de uma guanina por uma timina e de uma citosina por uma timina, respectivamente.....	49
<b>Tabela 10:</b> Comparações das sequências de nucleotídeos do gene ICP4 fragmento 2 de amostras de Minas Gerais, estirpes vacinais e outras estirpes do GaHV-1 publicadas no <i>genbank</i> .....	51
<b>Tabela 11:</b> Comparações das sequências de nucleotídeos do gene TK de amostras de Minas Gerais, estirpes vacinais e outras estirpes do GaHV-1 publicadas no <i>genbank</i> . A posição 568, apresenta a mutação exclusiva observada nas sequências obtidas, onde houve a substituição de adenina por uma citosina.....	55
<b>Tabela 12:</b> Comparações entre as sequências de aminoácidos do gene TK de amostras de Minas Gerais, estirpes vacinais e outras estirpes do GaHV-1, a partir da tradução de sequências depositadas no <i>Genbank</i> . As sequências obtidas apresentaram uma treonina na posição 252.....	57
<b>Tabela 13:</b> Comparações das sequências de nucleotídeos da região intergênica (IGSR) de amostras de Minas Gerais, estirpes vacinais e outras estirpes do <i>Mycoplasma gallisepticum</i> publicadas no <i>GenBank</i> . Posições 112 a 364. A estirpe 2011/3 apresentou maior variância entre as sequências obtidas, com duas mutações exclusivas dessa estirpe nas posições 364 e 459 da região intergênica.....	60
<b>Tabela 14:</b> Comparações das sequências de nucleotídeos do fragmento do gene <i>mgc2</i> de amostras de Minas Gerais, estirpes vacinais e outras estirpes do <i>Mycoplasma gallisepticum</i> publicadas no <i>genbank</i> .....	64
<b>Tabela 15:</b> Número de aves positivas e negativas pela técnica da PCR comparando aves vacinadas e não vacinadas com vacinas vectoradas (HVT ou FPV).....	67

---

## LISTA DE FIGURAS

---

<b>Figura 1:</b> Representação esquemática do histórico da LTI na região da serra Mantiqueira....	24
<b>Figura 2:</b> Mapa da região das terras altas da Mantiqueira na divisa entre os estados de	

Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo.....	25
<b>Figura 3:</b> Mapa fornecido pelo IMA (sistema de rastreabilidade espacial), com representação das cidade de Minas Gerais onde foram coletadas amostras de aves de postura: Passa-Quatro; Itamonte; Itahandú e Pouso Alto.....	26
<b>Figura 4:</b> Galinha de postura. A: Pulmão (Brônquio principal) apresentando infiltrado inflamatório linfocítico intenso expandindo a lamina própria. O epitélio respiratório permanece íntegro. H&E 100x. B: Traqueia apresentando infiltrado inflamatório linfocítico moderado expandindo a lamina própria. O epitélio respiratório permanece íntegro. H&E 400x. C: Corneto nasal apresentando infiltrado inflamatório linfocítico moderado expandindo a lamina própria. O epitélio respiratório permanece íntegro. H&E 400x.....	38
<b>Figura 5:</b> Galinha de postura com lesões sugestivas de LTI. A: Lúmen de traqueia apresentando acúmulo de células inflamatórias (linfócitos e plasmócitos) e hemácias associado à fibrina e células sinciciais onde corpúsculos de inclusão não foram observados. H&E 200x.....	39
<b>Figura 6:</b> Galinha de postura naturalmente infectada pelo GaHV-1. A: Traqueia apresentando infiltrado inflamatório linfocítico intenso expandindo a lamina própria, com descamação e fibrina. H&E 100x. B: Pulmão apresentando células sinciciais contendo corpúsculos de inclusão intranuclear (seta). H&E 400x.....	40
<b>Figura 7:</b> Galinha de postura naturalmente infectada pelo <i>Mycoplasma</i> spp. A: Traqueia apresentando espessamento difuso e acentuado caracterizado por infiltrado linfocitário em arranjo linfolicular (seta). H&E 200x. B: Traqueia apresentando substituição do epitélio respiratório normal por um epitélio simples não ciliado e achatado (seta na área de transição). H&E 400x.....	42
<b>Figura 8:</b> Galinha de postura naturalmente infectada pelo vírus da bronquite infecciosa (IBV). Traqueia apresentando infiltrado inflamatório linfocítico e heterofílico difuso acentuado expandindo a lamina própria. No epitélio havia perda dos cílios e necrose individual de células (setas). H&E 400x.....	43
<b>Figura 9:</b> Galinha de postura naturalmente infectada pelo vírus da bouba aviária (poxvírus). A: Concha nasal apresentando hiperplasia do epitélio de revestimento associado a numerosos corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos eosinofílicos em	

células epiteliais (setas). H&E 200x.....	44
<b>Figura 10:</b> Quantitativo de galinhas positivas pela PCR para o GaHV-1 no ano de 2012.....	45
<b>Figura 11:</b> Quantitativo de galinhas positivas pela PCR para o GaHV-1 no ano de 2013.....	45
<b>Figura 12:</b> Imagem de uma corrida de eletroforese para os diferentes agentes etiológicos: GaHV-1 (LTI) com produto de PCR de aproximadamente 237 pares de base; MS ( <i>Mycoplasma synoviae</i> ) com produto de 207 pares de base; e MG ( <i>Mycoplasma gallisepticum</i> ) com um produto de 185 pares de base. Gel de agarose (3%).....	46
<b>Figure 13:</b> Árvore filogenética gerada a partir da sequência de nucleotídeos dos fragmentos do gene ICP4 1 (688pb) e 2 (635pb) das estirpes de GaHV-1 e vacinais. Método: <i>Neighbor-joining</i> com análise <i>bootstrap</i> de 1000 repetições usando o modelo Kimura 2-parâmetros.....	53
<b>Figure 14:</b> Árvore filogenética gerada a partir da sequência de nucleotídeos dos fragmentos do gene TK das estirpes de GaHV-1 e vacinais. Método: <i>Neighbor-joining</i> com análise <i>bootstrap</i> de 1000 repetições usando o modelo Kimura 2-parâmetros.....	58
<b>Figure 15:</b> Árvore filogenética gerada a partir da sequência de nucleotídeos da região intergênica (IGSR) das estirpes de <i>Mycoplasma gallisepticum</i> e vacinais. Método: <i>Neighbor-joining</i> com análise <i>bootstrap</i> de 1000 repetições usando o modelo Kimura 2-parâmetros.....	62
<b>Figura 16:</b> Árvore filogenética gerada a partir da sequência de nucleotídeos do gene <i>mgc2</i> das estirpes de <i>Mycoplasma gallisepticum</i> e vacinais. Método: <i>Neighbor-joining</i> com análise <i>bootstrap</i> de 1000 repetições usando o modelo Kimura 2-parâmetros.....	66

---

## LISTA DE ANEXOS

---

<b>Anexo 1:</b> Questionário epidemiológico para aves de postura.....	83
<b>Anexo 2:</b> Tabela resumida de lesões histológicas observadas correlacionadas aos achados moleculares e conclusão diagnóstica final.....	85
<b>Anexo 3:</b> Certificado do comitê de ética em experimentação animal.....	100

## RESUMO

A laringotraqueíte infecciosa (LTI) é uma doença que acomete o aparelho respiratório de galinhas. Em novembro de 2010, foi notificada sua ocorrência no sul do Estado de Minas Gerais. Visando a necessidade de controle da doença, foram realizadas coletas periódicas programadas em 17 das 27 granjas da região. No total, 159 galinhas de postura de idades múltiplas foram necropsiadas, sendo coletadas amostras de seios e conchas nasais, laringe, traqueia, pulmões, conjuntiva e encéfalo para posterior processamento histopatológico. Para extração de DNA, foram coletados apenas traqueia e gânglio trigêmeo, e em seguida era procedida a PCR. Durante a vigência do projeto (2012-2013), ocorreram três episódios isolados (em diferentes momentos) sugestivos de LTI, relacionados com a introdução de aves não vacinadas. As galinhas foram examinadas por veterinários do Instituto Mineiro de agropecuária (IMA), e amostras foram coletadas e enviadas ao laboratório de patologia da UFMG (um total de 18 galinhas). Cinco amostras positivas para o vírus da LTI (GaHV-1), incluindo uma amostra de estudos anteriores (2011), tiveram fragmentos do genoma sequenciados. Dois fragmentos para o gene ICP4, e um fragmento para o gene TK, onde foram alinhados a outras estirpes depositadas no *GenBank*. As galinhas coletadas durante as visitas foram examinadas também quanto à presença de lesões histopatológicas sugestivas de outros patógenos respiratórios, e à PCR foram pesquisados *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae*. Um fragmento da região intergênica (IGSR) e um fragmento do gene *mgc2*, do genoma do *M. gallisepticum*, foram sequenciados e caracterizados. Dezoito codornas (*Coturnix japonica*) de postura da região também foram avaliadas quanto à presença de lesões para LTI à histopatologia, assim como para DNA viral à PCR. As galinhas coletadas durante as visitas programadas às granjas apresentaram lesões inespecíficas, e apenas quatro apresentaram células sinciciais à histopatologia, porém sem corpúsculo de inclusão. Já as galinhas enviadas pelo IMA, apresentaram lesões compatíveis com LTI, que consistiam em laringite e traqueíte fibrinosa aguda difusa moderada associada a descamação do epitélio e fusão de células epiteliais formando sincícios contendo corpúsculo de inclusão intranuclear. As amostras sequenciadas tiveram 100% de identidade entre elas, não havendo alteração nos fragmentos analisados durante três anos consecutivos (2011, 2012 e 2013). Além disso, as estirpes de Minas Gerais apresentaram mutações não sinônimas quando comparadas com as estirpes de um surto ocorrido em 2002, em São Paulo. As sequências obtidas não foram caracterizadas como de origem vacinal por não apresentaram as deleções observadas nas vacinas vivas atenuadas (CEO e TCO). Na análise do fragmento do gene TK não foi observada a mutação na posição 252 do gene, de uma treonina para metionina (relacionada a maior virulência da estirpe). Os achados epidemiológicos (baixa mortalidade e morbidade) associados à análise molecular do gene TK sugeriram que as estirpes eram de menor virulência. As vacinas vectoradas para LTI (FPV e HVT) foram implementadas na região em Agosto de 2011, porém, como esta alternativa começou a ser testada pela primeira vez no Brasil, tornou-se extremamente importante o seu acompanhamento. A introdução das vacinas vectoradas foram efetivas em reduzir a infecção viral, prevenindo a doença clínica e reduzindo a presença do DNA viral, especialmente no gânglio trigêmeo. Dentre as coinfeções observadas, a micoplasmose foi a principal, e a partir do sequenciamento de fragmentos do genoma, o *M. gallisepticum* foi caracterizado com alta variação nucleotídica entre as estirpes. As codornas não apresentaram lesões para GaHV-1 e os tecidos foram negativos à PCR, sugerindo que estas não estão envolvidas na manutenção do vírus na área. Embora a região não tenha apresentado outros surtos significativos de LTI, os resultados indicam que o vírus ainda encontra-se presente e circulante entre as aves e as granjas. Medidas de biossegurança devem ser adotadas, e visam reduzir ou impedir oportunidades de disseminação do vírus. Além disso, o programa de vacinação deve ser uniforme para evitar a infecção de aves susceptíveis e a ocorrência de doença clínica, e este deveria ser estendido não só as aves comerciais, como também às aves de subsistência.

**Palavras chaves:** laringotraqueíte infecciosa, GaHV-1, galinhas de postura, histopatologia, PCR, sequenciamento, *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*, codornas de postura.

## ABSTRACT

Infectious laryngotracheitis (ILT) is a disease that affects the respiratory tract of chickens. In November 2010, its occurrence has been reported in southern Minas Gerais. For control of the disease, regular scheduled collections of tissues in 17 of the 27 farms in the area were carried out. In total, 159 laying hens of multiple ages were necropsied, and samples of sinuses and nasal turbinates, larynx, trachea, lungs, brain and conjunctiva were collected for further histological processing. For DNA extraction only trachea and trigeminal ganglion were collected, and then PCR was performed. During the period of the project (2012-2013), three isolated episodes (at different times) suggestive of ILT, related to the introduction of unvaccinated birds occurred. The chickens (total of 18) were examined by veterinarians of Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA), and samples were collected and sent to the pathology laboratory at UFMG. Five positive samples for ILT virus (GaHV -1), including a sample from previous studies (2011), had their genome fragments submitted to sequencing. Two fragments of ICP4 gene and a fragment of TK gene, which have been aligned to other strains, were deposited in GenBank. The chickens collected during the visits were also examined for the presence of histopathological lesions suggestive of other respiratory pathogens, and PCR was performed for *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae*. Specific regions of the *M. gallisepticum* genome, a fragment of the intergenic region (IGSR) and a fragment of *mgc2* gene, were sequenced and characterized. Eighteen egg-laying quails (*Coturnix japonica*) of the region were also evaluated for the presence of lesions for ILT by histopathology, as well as PCR for viral DNA. The chickens collected during scheduled visits to the farms had nonspecific lesions, and only four showed syncytial cells at histopathology, but without intranuclear inclusion bodies. On the other hand, chickens sent by IMA showed lesions compatible with ILT, which consisted of acute moderate diffuse fibrinous laryngitis and tracheitis associated with desquamation of epithelium and fusion of epithelial cells forming syncytia containing intranuclear inclusion bodies. The samples were sequenced and 100 % identity was observed among them, with no change in the fragments analyzed for three consecutive years (2011, 2012 and 2013). Furthermore, strains of Minas Gerais showed non-synonymous mutations compared with strains from an outbreak occurred in 2002, in São Paulo. The sequences obtained were not characterized as vaccine strains because no deletions were seen, in contrast to the sequence of the live attenuated vaccines (CEO and TCO). In the analysis of the TK gene fragment, mutations were not observed at position 252 of the gene for a threonine to methionine (related to the increased virulence of the strain). The epidemiological findings (low mortality and morbidity) associated with molecular analysis of the TK gene suggested less virulent strains. The vector vaccines for ILT (HVT and FPV) were implemented in the region in August 2011; however, as this alternative began to be tested for the first time in Brazil, it has become extremely important to monitor the birds from that area. The introduction of vector vaccines was effective in reducing viral infection, preventing clinical disease and reducing the presence of viral DNA, especially in the trigeminal ganglion. Among the co-infections observed, mycoplasmosis was the most prevalent, and from the sequencing of genome fragments, the *M. gallisepticum* was characterized with high nucleotide variation among the strains. No lesions to GaHV-1 were observed in tissue of quails by histopathology and in addition, all of them were negative by PCR, suggesting that they are not involved in the maintenance of the virus in the area. Although no other significant outbreaks of ILT was reported in the area, these results indicate that the virus is still present and circulating among birds and poultry farms. Biosecurity measures must be adopted with the aim to reduce or prevent chances of spreading the virus. Moreover, the vaccination program should be uniform in order to avoid infection of susceptible birds and the occurrence of clinical disease, and this should be extended not only to commercial poultry, but to backyard chickens as well.

**Keywords:** infectious laryngotracheitis, GaHV-1, laying hens, histopathology, PCR, sequencing, *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*, quails.

## 1. INTRODUÇÃO

No Brasil, a avicultura emprega mais de 3,6 milhões de pessoas, direta e indiretamente, e responde por quase 1,5% do Produto Interno Bruto (PIB) nacional. A importância social da avicultura no Brasil se verifica também pela sua presença maciça no interior do país, principalmente nos estados do Sul e Sudeste. Em muitas cidades a produção de frangos é a principal atividade econômica. Em 2011, a produção brasileira atingiu a marca histórica de 13,058 milhões de toneladas, garantindo ao Brasil uma posição entre os três maiores produtores mundiais de carne de frango, junto aos Estados Unidos e a China. Na produção de ovos, o Brasil ocupa uma posição mais modesta, sétimo lugar e uma produção que corresponde a apenas 3% do total mundial (UBABEF, 2013).

As doenças respiratórias compreendem o principal problema sanitário que levam a perdas na produtividade, e o sistema de criação moderno, baseado em alta densidade, contribui para a deterioração da qualidade do ar aumentando seus riscos (Guy e Garcia, 2008).

Dentre essas doenças, destaca-se a laringotraqueíte infecciosa aviária (LTI), que é uma doença viral de notificação compulsória a OIE (*Office International des Epizooties - World Organization for animal health*), sendo uma doença aguda e altamente contagiosa que acomete o trato superior das aves. As perdas econômicas atribuídas têm sido importantes em muitos países produtores de aves, induzindo prejuízos econômicos significativos devido à alta morbidade, mortalidade variável, e também pela diminuição de postura, além da perda de peso e susceptibilidade a outras infecções respiratórias (Guy e Bagust, 2003). Apesar de todas as estirpes do vírus da LTI parecerem ser antígenicamente similares, a virulência das estirpes varia de

forma considerável, resultando em infecções que vão de subclínicas até uma doença respiratória grave com alta mortalidade. As aves afetadas pela forma mais virulenta apresentam sinais clínicos e lesões na traqueia altamente característicos da doença, porém a forma mais branda pode se tornar indistinguível de outras doenças respiratórias (Garcia e Riblet, 2001).

Os surtos podem ocorrer devido ao uso de vacinas vivas atenuadas, as quais possuem a capacidade de reverter sua virulência. Esses surtos são explicados pela disseminação do vírus vacinal, o qual pode adquirir virulência após a passagem de ave para ave (Clavijo e Éva, 1997). Alternativamente, para evitar o problema da reversão da virulência, uma nova geração de vacinas vectoradas utilizando poxvírus aviário ou herpesvírus de perus geneticamente modificado com expressão gênica do vírus da LTI tem sido desenvolvidas e implementadas no seu controle (Tong et al., 2001 e Johnson et al., 2010).

Um estudo demonstrou que o sequenciamento de DNA pode ser usado para o monitoramento e levantamento epidemiológico, contribuindo para a identificação da origem do vírus envolvido nos surtos e/ou tipificando o vírus circulante, principalmente do gene ICP4 (*infected cell protein*), (Chacon e Ferreira, 2009). A sequência do gene TK (*thymidine kinase*) por sua vez, pode ser utilizada para diferenciar isolados de alta ou baixa virulência (Han e Kim, 2001).

Dessa forma, o objetivo deste estudo foi monitorar galinhas de postura comercial com vacinação vectorada contra a LTI, incluindo a caracterização molecular do GaHV-1 circulante no período de 2011-2013, juntamente com reconstruções filogenéticas com base em sequências de genes ICP4 e TK.. Além disso, também foi realizado um estudo sobre sua detecção em

outros possíveis hospedeiros como as codornas e seus diagnósticos diferenciais, incluindo a caracterização molecular de estirpes de *M. gallisepticum* com base em sequências da região intergênica (IGSR) e do gene *mgc2*.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 – Etiologia

A LTI é uma doença onde o agente etiológico é o vírus da laringotraqueíte infecciosa, membro da família Herpesviridae, do gênero *Iltovirus*. O vírus é taxonomicamente identificado como *Gallid herpesvirus 1*, GaHV-1 (Guy e Bagust, 2003). O genoma é constituído por fita dupla linear de DNA, com aproximadamente 155 Kb constituído de uma região longa única (UL) de 120 kb e uma região curta única (US) de 17 kb, flanqueada por regiões chamadas de sequências repetidas invertidas (IR e TR) de 9 kb cada uma. Onze regiões codificadoras de proteína - *open reading frame* (ORF) conservadas do vírus possuem homologia com as glicoproteínas do genoma do *Herpesvirus simplex tipo 1*, denominadas gB, gC, gD, gE, gF, gG, gH, gI, gL, gM e gN (Fuchs et al., 2007).

A gB é essencial para a fixação e penetração dos vírus nas células hospedeiras. Ela está envolvida na propagação célula a célula e na formação de sincícios (Liang et al., 1991; Okazaki, 2007). A gB induz ainda resposta imune humoral e mediada por células (Tong et al., 2001). A gC é uma proteína estrutural e não essencial para a replicação viral em cultura de células. Esta glicoproteína está envolvida na adesão viral e na sua virulência (Mettenleiter et al., 1990). A gE e gI são proteínas não-essenciais e desempenham um papel significativo na difusão de célula a célula pelo GaHV-1 (Devlin et al., 2006a). A gG serve como um fator de virulência. Vírus com deficiência de gG tem menor virulência, produzem sinais clínicos mais brandos, e tem menor efeito sobre a mortalidade (Devlin et al., 2006b). A gJ é uma glicoproteína não essencial e estrutural. Sua deficiência tem mostrado

efeitos menores sobre a propagação célula a célula pelos vírus. Além disso, reduz a virulência (Fuchs et al., 2005). A gM e gN são importantes para a replicação dos alphaherpesvirus em cultura de células (Roizman e Knipe, 2001).

A proteína reguladora de transcrição, também conhecida como proteína da célula infectada 4 (ICP4) é produzida antes do início do ciclo de replicação. Ela é responsável pela regulação da expressão de genes precoces e tardios na infecção dos herpesvírus (Jonhson et al., 1995, Chang et al., 1997, Graham et al., 2000). O ICP4 tem capacidade de autorregulação e regula a expressão de outros genes por ligação direta nos sítios de alta afinidade dentro dos promotores dos genes de infecção precoce (Jonhson et al., 1995). A ORF codificante da ICP4 possui 4386 nucleotídeos, contendo dois domínios de alta homologia que têm sido relatados como sendo regiões conservadas entre os alphaherpesvírus. A ICP4 é uma região funcionalmente importante, sendo relacionada com a regulação gênica.

Já a sequência completa do gene *thymidine kinase* (TK), localizada na região única longa (UL23), foi realizada por Griffin e Boursell (1990) e um fragmento desta sequência pode ser utilizada para diferenciar isolados de alta ou baixa virulência (Han e Kim, 2001).

No momento da infecção, o vírus se liga 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 e Garcia, 2008).

### 2.2 – Epidemiologia

A ocorrência da LTI foi comprovada em diversos países como EUA (Guy et al., 1991), Austrália (Coppo et al., 2012), Itália



(Moreno et al., 2010), Inglaterra (Hughes et al., 1991), Irã (Sadeghi et al., 2011), Canadá (Ojkic et al., 2006) e Suíça (Neff et al., 2008). No Brasil a primeira descrição de isolamento e identificação do GaHV-1 foi em 1974 (Hipólito et al., 1974). No Estado do Rio de Janeiro, foi descrita a primeira epidemia severa entre 1981 e 1982 (Araújo et al., 1982). Estas constatações não foram notificadas às autoridades sanitárias, e, com isso, nenhuma medida de Defesa Sanitária Animal foi tomada para o seu controle, sendo assim o uso de vacinas vivas atenuadas ainda não havia sido autorizado em nosso país.

Em dezembro de 2002, foi descrito no Estado de São Paulo um surto de LTI, incluindo a presença de vírus vacinal, no município de Bastos, atingindo 182 propriedades de exploração de aves para postura comercial de ovos (Chacon e Ferreira, 2009). A notificação ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), em dezembro de 2002, proporcionou o início dos trabalhos de investigação epidemiológica e a publicação da Portaria CDA nº2 (São Paulo, 2003) que proibiu o trânsito interestadual de aves de postura adultas para qualquer finalidade, com o objetivo de impedir a disseminação da doença para outras unidades da Federação (São Paulo, Estado, 2003).

Em novembro de 2010, o Instituto Mineiro de Agropecuário (IMA) notificou pela primeira vez ao MAPA uma suspeita da doença no sul do Estado de Minas Gerais. Logo após a notificação pelo veterinário responsável, as granjas foram interditadas pelo serviço oficial. Amostras teciduais foram coletadas e a infecção das aves pelo GaHV-1 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, encontram-se Itanhandú, Passa Quatro, Pouso Alto e Itamonte. O surto de laringotraqueíte no Estado de Minas Gerais foi descrito posteriormente por Preis et al., (2013b).

### **2.3 – Infecção e patogenia**

A galinha é o hospedeiro primário e natural do GaHV-1. Alguns trabalhos têm descrito a doença também em faisões e pavões (Graham & Boycott, 1981) e em perus (Portz et al., 2008). A porta de entrada do vírus são as vias respiratórias superiores e a via oral. As aves com infecção clínica são as principais fontes de transmissão. No entanto, a transmissão também pode acontecer a partir de cama e materiais contaminados. Em um estudo sobre a transmissão indireta da LTI, Kingsbury e Jungherr (1957), atribuíram a transmissão à falta de desinfecção de roupas e pertences dos trabalhadores das granjas, ao acesso de cães e corvos às carcaças de aves. Também atribuíram a transmissão a métodos inadequados de eliminação de carcaças, onde havia o empilhamento de carcaças em incineradores e em lixões, onde havia a presença de ratos.

Não foi comprovada a transmissão vertical (Cover, 1996). As vias de eliminação do vírus são as secreções oronasais e tem início de seis a oito dias após infecção (Purcell e McFerran, 1969), sendo que o período de incubação da doença é de seis a doze dias para infecção natural. Já em inoculação experimental intratraqueal, o período de incubação é de dois a quatro dias (Kernohan, 1931).

O vírus multiplica-se principalmente no epitélio da laringe e traqueia, e em outras membranas e tecidos como a conjuntiva, mucosa nasal e dos seios, sacos aéreos e pulmões, estando presente nos tecidos da traqueia e na secreção traqueal por seis a oito dias após a incubação (Guy et al., 1991). A infecção do trato respiratório na ausência de sinais clínicos é a principal característica que favorece a persistência do vírus em uma população, tendo sido comprovada sua duração de latência em até 16 meses no gânglio do nervo trigêmeo em 2% das aves infectadas com o vírus de campo e em 50% ou mais pelo mesmo período em galinhas inoculadas com vírus vacinal (Bagust, 1986).

### **2.4 - Sinais clínicos**

Os sinais clínicos predominantes ocorridos nos surtos incluem redução na alimentação

e consumo de água e variam de acordo com a forma da doença. Na forma leve incluem apatia, espirros, descarga nasal e conjuntivite, além da diminuição na alimentação e consumo de água. Na forma severa pode haver expectoração de muco sanguinolento, inchaço evidente dos seios nasais, paranasais (infra-orbitários), dispneia grave e tosse. Nos casos severos, a morte ocorre em dois ou três dias. Além disso, a doença leva a uma redução na produção de ovos (Moreno et al., 2010).

## 2.5 - Lesões macroscópicas

As lesões macroscópicas são observadas mais frequentemente no trato respiratório superior, em especial na laringe e traqueia, e variam de um acúmulo de muco nos casos mais brandos (Linares et al., 1994; Timurkaan et al., 2003) a uma 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. Em vários casos, acúmulo de material caseoso com fibrina pode ser observado na laringe e parte inicial da traqueia, levando a morte por sufocamento. Quando as aves morrem dessa forma, é comum a ocorrência de cianose que pode ser observada no momento da morte.

## 2.6 - Lesões histológicas

Histopatologicamente as primeiras mudanças morfológicas são a hiperplasia e hipertrofia das células caliciformes, sendo que os sítios primários da infecção do vírus da LTI são células não ciliadas. Em seguida há uma descamação do epitélio, com acúmulo abundante de exsudato serofibrinoso e restos celulares. As poucas células epiteliais remanescentes da mucosa devastada proliferam a partir do sexto dia pós-infecção, e a traqueia obtém um epitélio normal sem a proliferação de

fibroblastos, que resultaria em regeneração (Hayashi et al., 1985).

A fusão das células epiteliais formando grandes sincícios com corpúsculos de inclusão intranucleares podem ser visíveis entre o primeiro e quinto dia pós-infecção, desaparecendo em função da descamação epitelial (Purcell, 1971). Timurkaan et al., (2003), observaram também exsudato contendo restos de células epiteliais, heterófilos e hemácias no lúmen da laringe, traqueia e cavidade nasal. Sellers et al., (2004) afirmam que nem sempre as lesões histológicas estão presentes como na forma clássica da LTI, desta forma, os corpúsculos de inclusão intranucleares apresentaram-se infrequentes, apesar de patognomônicos, tornando o diagnóstico histopatológico difícil. Os corpúsculos de inclusão são resultado da atividade bioquímica de replicação viral no núcleo da célula (Reynolds et al., 1967).

## 2.7 - Diagnóstico

A doença grave pode ser diagnosticada com base no histórico, sinais clínicos, lesões na necropsia e achados histopatológicos característicos. Exames complementares para detecção viral são necessários para confirmar o diagnóstico da doença subclínica, também chamada de silenciosa (Timurkaan et al., 2003). A imunidade contra a LTI em galinhas é determinada primariamente pela resposta imune mediada por células. Portanto não é recomendado o monitoramento sorológico das aves vacinadas com a vacina viva atenuada usando teste de ELISA (Clavijo e Éva, 1997).

O isolamento viral pode ser feito pela inoculação de suspensões virais de exsudatos respiratório e conjuntival, ou raspados de traqueias, na MCA (membrana corioalantóica) de ovos embrionados SPF (*Specific Pathogen Free*) de 9 a 10 dias de incubação. Após dois a cinco dias de inoculação, há produção de placas opacas na MCA (efeito citopático) ou morte embrionária (Hughes e Jones, 1988).

Para um diagnóstico mais rápido, a técnica de reação em cadeia pela polimerase (PCR) aliada a análise de polimorfismo de

fragmentos de restrição (RFLP) mostrou-se como uma escolha racional, pois permitia detectar e rastrear a origem de uma determinada variante do vírus (Clavijo e Éva, 1997). Em países onde a vacinação viva atenuada é aconselhada, como nos Estados Unidos, foram utilizados protocolos de PCR-RFLP com o objetivo de indicar evidências moleculares de que surtos de LTI estavam relacionados com isolados vacinais que reverteram virulência após passagens em aves susceptíveis (Oldoni e Garcia, 2007).

Estudos recentes demonstraram que o sequenciamento de uma região específica do genoma (ICP4) podem gerar resultados confiáveis para a diferenciação entre as cepas vacinais e selvagens ou de campo. Além disso, o sequenciamento de DNA pode ser usado para monitoramento e estudos epidemiológicos, contribuindo para a identificação da origem do vírus envolvido nos surtos e/ou tipificando o vírus circulante (Chacon e Ferreira, 2009).

Uma vez que as lesões e sinais clínicos respiratórios são bastante semelhantes entre os diferentes patógenos respiratórios em aves, para o diagnóstico conclusivo da LTI, são necessários exames complementares como a PCR e/ou isolamento viral (Sellers et al., 2004). A detecção do agente viral pode ser feita ainda por imunofluorescência direta, hibridização de DNA e imuno-histoquímica (Guy e Garcia, 2008).

A imuno-histoquímica para LTI é baseada na observação de sinal positivo para marcação da proteína viral gJ no citoplasma de células sinciciais, assim como de células aparentemente normais (Fuchs et al., 2007). Uma das vantagens da imuno-histoquímica em relação a técnica de PCR é a possibilidade da visualização da lesão associada ao agente infeccioso, confirmando a ocorrência e também demonstrando a distribuição do vírus pelos tecidos. Anticorpos monoclonais específicos para as proteínas gC e gJ são os mais utilizados na imuno-histoquímica e imunofluorescência, uma vez que aves infectadas pelo GaHV-1 produzem anticorpos contra essas duas proteínas (Fuchs et al., 2007).

## 2.8 – Controle

### 2.8.1 – Biossegurança

Medidas de vazio sanitário e higiene, cuidados com objetos, equipamentos e veículos potencialmente contaminados, e controle de roedores e cães representam medidas de importância vital. O vírus é sensível ao clorofórmio e éter, e é inativado pelo calor quando exposto a 38°C por 24 horas (Fitzgerald e Hanson, 1963; Meulemans e Halen, 1978; Giambrone et al., 2008). Apesar do vírus da LTI ser sensível ao calor, ele pode sobreviver na cama e em carcaças por alguns meses (Kingsbury e Jungherr, 1957).

Giambrone e Macklin (2011) demonstraram que o ácido cítrico e o hipoclorito de sódio não são adequados para a inativação do vírus vacinal (atenuado), utilizado em sistemas de abastecimento de água (permanecendo em biofilmes dos bebedouros). Entretanto, estes mesmos autores afirmaram que o bissulfato sódico e peróxido de hidrogênio são efetivos em remover o vírus. O GaHV-1 é sensível aos agentes lipolíticos e desinfetantes comuns (Hanson, 1991).

A restrição de hospedeiros ao vírus da LTI, a instabilidade do vírus ao meio ambiente e a ineficiência da transmissão vertical, são fatores que permitem que ações restritivas de biossegurança evitem a disseminação da doença. Além dessas, a eliminação de aves afetadas ou identificadas como albergando a forma latente do vírus e a vacinação também podem ter resultados eficientes. A latência é certamente o maior impedimento para os programas de controle da laringotraqueíte infecciosa (Bagust e Johnson, 1995).

### 2.8.2 - Vacinação

Dois tipos de vacinas vivas atenuadas têm sido utilizados amplamente no controle da doença: a vacina atenuada por uma série de passagens em ovos embrionados (CEO – *chicken embryo origin*) (Samberg et al., 1971); e a vacina gerada por múltiplas passagens em cultura de tecidos (TCO –

*tissue culture origin*) (Gelenczei and Marty, 1964). A CEO oferece melhor proteção quando comparada a TCO, que oferece menor resposta vacinal. Ambos os vírus vacinais TCO e CEO possuem considerável virulência residual (Guy et al., 1991).

### **2.8.2.1 – Vias de administração e reação pós-vacinal**

As vacinas vivas ou inativadas podem ser administradas ao lote inteiro, através da água de beber ou nebulização, ou às aves individualmente, especialmente pelo método de colírio, injeção ou perfuração da membrana da asa (Garcia e Riblet, 2001).

Devido à severidade das reações pós-vacinais para LTI, as várias vias de administração foram extensivamente estudadas. Da mesma forma que o vírus selvagem, vacinas vivas com o vírus modificado podem produzir sinais clínicos da doença, lesões traqueais, redução do ganho de peso e mortalidade, dependendo da estirpe e da idade das aves afetadas (Guy e Garcia, 2008).

Vacinações via água de bebida e aspersão foram rotineiramente usados na indústria de frangos de corte (Guy e Garcia, 2008). Ainda que a administração através da água de bebida seja muito segura, a rapidez, a duração e a homogeneidade da proteção não são tão eficientes como a proporcionada pela vacinação individual pelo método de colírio. A proteção não uniforme da vacinação na água de bebida pode ocorrer por doses sub-ótimas da vacinação recebida por cada ave, ou, algumas aves podem não beber a água contendo vacina no tempo em que a vacina ainda está viável (Rodriguez-Avila et al., 2008). A via de administração pela água de bebida também apresenta o fato de que os vírus de vacinas vivas derivadas de CEO podem aderir a biofilmes no sistema de água de bebida, e podem permanecer na água e infectar as aves de novos lotes não vacinados. Resíduos na água de bebida podem promover uma fonte de transmissão de ave para ave, resultando em reversão da virulência (Giambrone e Macklin, 2011).

A replicação dos vírus vacinais na mucosa da traqueia varia dependendo da via de administração. A efetividade da vacinação depende da infecção da mucosa nasal, sendo assim o sucesso na transmissão do vírus vacinal da LTI ocorre no início da infecção, enquanto o vírus está ativo replicando na mucosa traqueal. A administração por nebulização é eficaz, mas aumenta a reação pós-vacinal, já que a vacina alcança o trato respiratório médio e profundo. A dose da vacina nunca deve ser reduzida na tentativa de reduzir a reação pós-vacinal. O resultado seria uma infecção recorrente e uma imunização ineficiente (Coppo et al., 2012).

### **2.8.2.2 - Reversão da virulência**

Nos últimos 40 anos nos Estados Unidos, a vacinação viva atenuada foi a principal ferramenta usada para controlar o avanço da LTI. A vacinação, com vacinas atenuadas, produz bons resultados, mesmo durante surtos clínicos que afetam animais não previamente vacinados. Os anticorpos maternos não dão proteção, assim as aves podem ser vacinadas no primeiro dia, com a proteção tornando-se eficaz de seis a oito dias após a administração. Contudo, a vacinação é reservada para aquelas áreas onde o GaHV-1 está presente, ou se sabe, que está nas vizinhanças, já que os vírus vacinais persistem no ambiente após a vacinação. Garcia e Riblet, (2001), demonstraram ainda que diferentes áreas geográficas dos Estados Unidos, onde a vacinação com CEO é uma prática comum, 75% dos isolados dos surtos são derivados da vacina, a qual em aves não protegidas pode promover a reversão da virulência, após a passagem de ave para ave, resultando em surtos.

Em um surto ocorrido na Carolina do Norte os vírus vacinais foram indistinguíveis dos isolados obtidos a partir do surto baseado na análise de endonucleases de DNA de restrição (Guy et al., 1989). A replicação das vacinas CEO e TCO de LTI são similares, ambas apresentaram uma replicação local na conjuntiva do olho e traqueia, e possuem a capacidade de transmitir por contato a aves expostas, porém as vacinas CEO replicam e se

espalham mais rapidamente que as vacinas TCO (Rodríguez-Avila, et al., 2007).

A reversão de virulência em amostras vacinais já foi demonstrada para outros agentes como o vírus da bronquite infecciosa (Hopkins e Yoder, 1984), poliovírus humano (Cann et al., 1984) e o vírus da cinomose (Appel, 1978).

Estudos onde amostras vacinais de LTI foram sequencialmente passadas de ave para ave, demonstraram que sua transmissão em aves promove a perda da atenuação e a reversão em virulência. Por exemplo, um vírus atenuado em 20 passagens embrionárias ou celulares pode reverter a patogenicidade após 10 passagens em aves susceptíveis (Guy et al., 1989).

Evidências indicam que surtos em lotes vacinados foram causados por uma imunidade baixa frente às vacinas com títulos virais baixos. Em alguns casos, surtos esporádicos em lotes vacinados podem ocorrer pela reativação do vírus vindo de uma fase latente. Fatores estressantes como muda forçada, início da maturidade sexual e realojamento vão induzir uma fase de reativação em que o vírus ativa sua replicação, e, em consequência, há o retorno da eliminação do vírus (Hughes et al., 1991). O mecanismo que leva ao aumento da virulência das vacinas CEO ainda não foi determinado. O aumento da virulência poderia ocorrer por mutação, como demonstrado em vacinas para poliovírus em humanos (Cann et al., 1984), ou pode resultar da seleção de subpopulações virulentas, como demonstrado no vírus da influenza aviária (Brugh, 1988).

### 2.8.2.3 – Vacinas vectoradas

Recentemente, foi desenvolvida uma nova geração de vacinas recombinantes ou vectoradas a partir do poxvírus aviário ou herpesvírus dos perus, produzindo vacinas que carregam genes da LTI. A vacina vectorada FPV (*Fowlpoxvirus*) – LTI (Vectormune® FP-LT; Ceva Animal Health, Lenexa, KS, USA) expressa glicoproteínas do GaHV-1, a glicoproteína B (gB) e genes UL-32, e é aconselhada a

administração via membrana da asa em aves de 1 semana de idade. Outra vacina disponível para comercialização no Brasil é a vectorada LTI - Doença de Marek, utilizando como vetor HVT (*herpesvirus of turkeys*), codificando a glicoproteína I (gI) e gD (Innovax®-ILT; Intervet International B.V., Whitehouse Station, NJ, USA), que possui aplicação *in-ovo*, em embriões de 18 dias de idade (Coppo et al., 2013).

Tong et al. (2011), testou a eficácia da proteção de uma vacina vectorada (FPV) com expressão da glicoproteína gB do vírus LTI em frangos livres de patógenos específicos (SPF) e comerciais. Seus resultados indicaram um grau de proteção imune similar a induzida pelas vacinas convencionais vivas atenuadas. A vantagem dessa vacina é a ausência de transmissão de ave para ave e, também, não causando infecção latente ou reversão de virulência. Assim, essa nova vacina vectorada oferece uma vacinação mais segura, alternativa para as vacinas atenuadas, CEO e TCO.

Em outro estudo realizado por Davison et al., (2006), o autor sugere que a vacina deve ser aplicada cuidadosamente em cada ave para obter a proteção uniforme do lote, sendo que esta deve ser aplicada na membrana da asa. Porém em aves expostas previamente ao poxvírus ou quando é feita administração imprópria da FPV-LTI a proteção pode ser inadequada. Em um estudo feito por Johnson et al. (2010), em regiões com forte desafio viral, as vacinas vectoradas falharam em garantir proteção contra a doença, entretanto em regiões com desafio viral leve a moderado, essas vacinas foram eficientes.

## 2.9 Diagnóstico diferencial

Uma grande variedade de patógenos tem sido associada a infecções respiratórias em aves, incluindo o GaHV-1, e dentre seus principais diagnósticos diferenciais encontram-se: metapneumovírus aviário (AMPV), (Cavanagh et al., 1999), influenza vírus aviário (AIV), (Chacón et al., 2007), vírus da bronquite infecciosa (IBV) (Cavanagh et al., 2002), vírus da doença de Newcastle (NDV), (Pang et al., 2002), forma diftérica do poxvírus aviário

(Fatunmbi et al., 1995), além de infecções bacterianas, como *Mycoplasma* spp. (Nascimento et al., 1993; Lauerman, 1993), *Avibacterium paragallinarum* (Scholz et al., 1994) e *Ornithobacterium rhinotracheale* (Canal et al., 2005). Esses patógenos respiratórios são de grande importância, uma vez que podem causar doença independentemente ou em associação (Yashpal et al., 2004). As severidades das lesões podem ser exacerbadas e prolongadas por infecções concorrentes (Mohamed et al., 1969) ou ainda, no caso de aves expostas a condições de imunossupressão causada por exemplo por micotoxicoses ou o vírus da doença infecciosa da bursa (Otim et al., 2005).

A micoplasmose atualmente é o maior problema mundial na indústria avícola, devido aos prejuízos econômicos como condenação ou menor rendimento de carcaça, redução na produção de ovos e aumento do gasto com medicamentos. O controle da infecção pelo *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae* tem sido baseado na biossegurança. Nas áreas onde a erradicação por esses métodos é difícil de atingir, a vacinação com vacinas vivas atenuadas é utilizada como alternativa na estratégia de controle (Whithear et al., 1996). Com o aumento mundial do uso dessas vacinas vivas, o desenvolvimento de técnicas que permitam a diferenciação das estirpes selvagens das estirpes vacinais é particularmente importante.

Algumas técnicas tem sido desenvolvidas para diferenciação das diferentes estirpes, incluindo análise do perfil de proteínas (Khan et al., 1987), polimorfismo no comprimento do fragmento de restrição (RFLP - *Restriction Fragment Length Polymorphism*) (Kleven et al., 1988) e PCR utilizando primers específicos (Nascimento et al., 1993).

Recentemente, métodos de sequenciamento têm sido introduzidos como uma nova ferramenta para o estudo da epidemiologia molecular do *Mycoplasma gallisepticum*. Diferentemente de outros meios usados para sua identificação, os métodos de sequenciamento não requerem o isolamento

do organismo testado em meios de cultura, o que representa uma vantagem significativa. O sequenciamento de regiões alvo é um método de diferenciação altamente reprodutivo e permite o desenvolvimento de um banco de dados comparáveis entre laboratórios (Ferguson et al., 2005).

Sequenciando um maior número de alvos genéticos aumenta o poder de discriminação das diferentes estirpes (sequenciamento *multilocus*). Para a bactéria *M. gallisepticum*, o poder discriminatório máximo é obtido sequenciando os genes IGSR (*intergenic spacer region*) e *mgc2* (*M. gallisepticum cytoadhesin*) (Armour et al., 2013). A região intergênica (IGSR), localizada entre os genes 16S e 23S ribossomais dos micoplasmas tem sido demonstrada como sendo variável nas sequências e em tamanho entre as espécies de micoplasma (Raviv et al., 2007). O gene *mgc2* codifica uma citoadesina secundária que possui a função de participar no processo de adesão ao epitélio respiratório do hospedeiro (Ferguson et al., 2005).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivos gerais

- Identificação de galinhas que alberguem o GaHV-1 utilizando técnicas laboratoriais para diferenciar aves doentes e/ou aparentemente saudáveis da região da Mantiqueira, que inclui os municípios de Itanhandú, Itamonte, Passaquatro e Pouso Alto.
- Confirmar a presença do GaHV-1 a partir de material genético (DNA) coletado da traqueia e gânglio do nervo trigêmeo com oligonucleotídeos iniciadores específicos.
- Determinar o comportamento da atividade viral (GaHV-1) pela PCR e sequenciamento na região do foco antes e após a

introdução de uma vacina recombinante para o controle da doença.

- Avaliar pela histopatologia e pela PCR a presença de infecções concomitantes que sugerem associação com outro agente etiológico como *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae*.
- Avaliar macroscopicamente, histopatologicamente e pela PCR a infecção pelo GaHV-1 em outros possíveis hospedeiros, como as codornas.

### 3.2. Objetivos específicos

- Avaliar macroscopicamente e histopatologicamente os tecidos respiratórios e relacionar com as lesões específicas do vírus da laringotraqueíte infecciosa.
- Associar as alterações macroscópicas e histopatológicas características das doenças investigadas e relacionar com os testes específicos com o intuito de estabelecer a ocorrência de doença clínica no animal e não apenas a infecção (em vista do estado de latência do vírus da laringotraqueíte e estado portador ou estirpe vacinal para outros agentes).
- Testar amostras teciduais congeladas incluindo traqueia e gânglio do nervo trigêmeo pela PCR comparando aves vacinadas e não vacinadas com vacinas vetorizadas.
- Caracterização molecular do GaHV-1 pelo sequenciamento de nucleotídeos, pela obtenção de sequências nucleotídicas de genes virais para se realizar um estudo filogenético em comparação com amostras descritas em outros estados e/ou países. Além disso, estabelecer se o vírus tem relação com cepas vacinais originadas de vacinas vivas

atenuadas em embrião (CEO) ou tecido celular (TCO).

- Determinar a patogenicidade ou virulência do vírus pela mortalidade, morbidade, sinais clínicos, lesões e análise da sequência timidina quinase (gene TK).
- Obter, dos casos positivos para *Mycoplasma gallisepticum*, sequências nucleotídicas caracterizando a estirpe envolvida na infecção, se vacinal ou selvagem.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Histórico

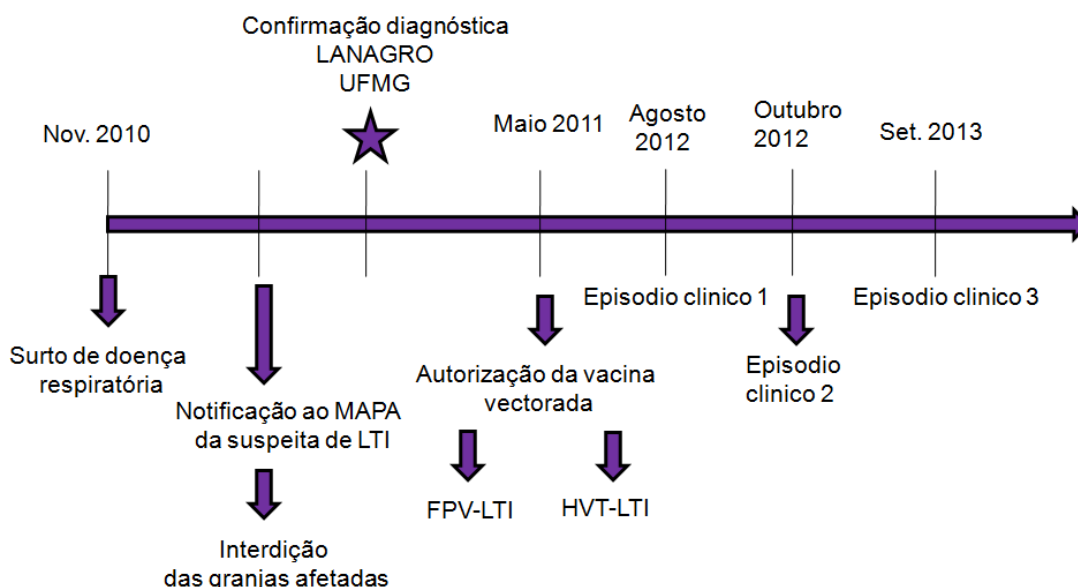
Em novembro de 2010, ocorreu um surto de doença respiratória na região sul de Minas Gerais que levou à queda da produção de ovos e aumento da mortalidade, em uma área com grande concentração de galinhas de postura comercial variando de 100.000 a 2.900.000 entre as granjas (Preis et al., 2013b). Os sinais clínicos apresentados pelas aves, bem como as lesões macroscópicas, sugeriram tratar-se de um surto de LTI. Responsáveis técnicos das granjas notificaram a suspeita ao IMA 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 medidas restritivas para comercialização de aves, e o transporte da cama de frango e de carcaça foram implementadas. Posteriormente foi realizada coleta de material para a confirmação da suspeita.

Foram coletados suabes de traqueia, sangue, e cabeça com a traqueia das aves doentes e enviada ao Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO), de São Paulo, no qual foi confirmado o surto de LTI pela PCR. Os quatro municípios envolvidos no surto foram: Itamonte, Itanhandú, Passa-Quatro e Pouso Alto. 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 vacinas vectoradas (FPV-LTI e HVT-LTI) para controle do surto, associada a medidas de biossegurança, ficando proibida na região a vacinação com vacinas vivas atenuadas. A vacinação com a vacina vectorada foi iniciada em agosto de 2011, acompanhada pelo serviço veterinário oficial do IMA, no incubatório e/ou aos 26 a 35 dias de idade. Como essa alternativa para o controle da LTI começou a ser testada nessa região pela primeira vez no Brasil, tornou-se extremamente importante o acompanhamento para detectar o

comportamento dos níveis de atividade viral das granjas do foco.

Três surtos ocorreram durante a vigência do projeto, de aves que foram introduzidas sem vacinação para laringotraqueíte infecciosa aviária na região. O primeiro ocorreu em agosto de 2012, o segundo em outubro de 2012 e o terceiro em setembro de 2013, onde as aves apresentaram sinais de doença respiratória aguda grave. A representação esquemática resumindo o histórico da doença na região da serra da Mantiqueira pode ser observada na figura 1.



**Figura 1:** Representação esquemática do histórico da LTI na região da serra Mantiqueira.

## 4.2 Localização das granjas

Foram estudadas galinhas e codornas de postura de granjas comerciais localizadas no sul do estado de Minas Gerais, na região da Serra da Mantiqueira (Figura 2), nas cidades Itanhandú, Itamonte, Passa-Quatro e Pouso Alto. A região localiza-se a aproximadamente 450 km de Belo Horizonte. Nesta região está concentrada a maior produção de ovos do Estado, com 27 granjas e uma população de

aproximadamente 10.000.000 de aves (Figura 3).

As granjas são divididas em média entre quatro a 25 galpões, sendo as galinhas divididas entre 17 e 95 semanas de idade, e em algumas até 110 semanas. Algumas das granjas fazem sua própria recria, possuindo então alguns galpões para criação das aves até o momento da postura. Outras possuem galpões automatizados, onde as aves são criadas em gaiolas dispostas em seis

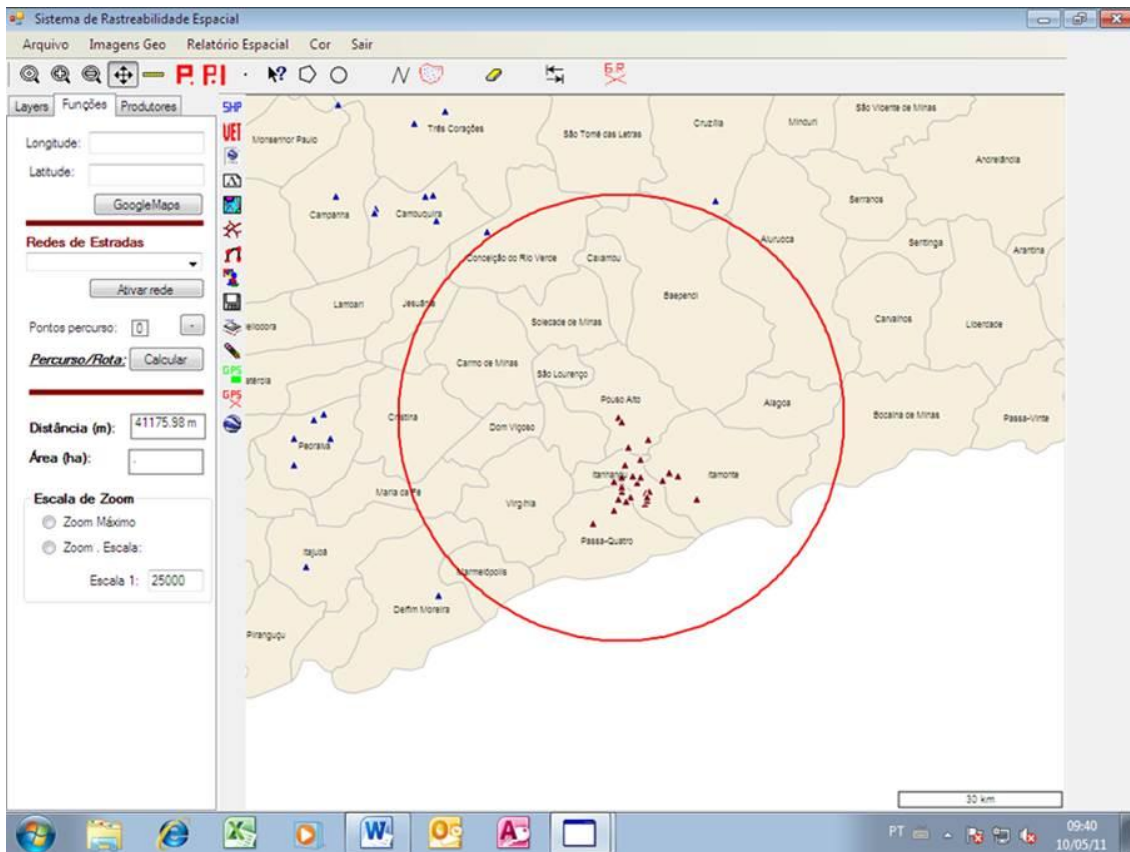


andares com ração e água fornecidos automaticamente e a produção (ovos) e as excretas removidos automaticamente por esteiras. A produção de ovos nessa região

representa mais de 11% da produção nacional, sendo Minas Gerais o segundo maior produtor do país.



**Figura 2:** Localização geográfica da região das terras altas da Mantiqueira na divisa entre os estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo. Fonte: <http://www.pastordamantiqueira.com.br/localizacao.php>



**Figura 3:** Sistema de rastreabilidade espacial, com representação das cidade de Minas Gerais onde foram coletadas amostras de aves de postura: Passa-Quatro, Itamonte, Itahandú e Pouso Alto. Em azul estão representadas granjas de recria, e em vermelho granjas de postura. Fonte: IMA.

### 4.3 Coleta das amostras, avaliação dos sinais clínicos e necropsia

Amostras foram coletadas durante o período de março de 2012 a setembro de 2013 da seguinte forma: as aves foram selecionadas pela idade e fases da produção. Nas granjas de poedeiras que fazem recria, uma coleta foi feita nos pinteiros, outra na fase de recria, no pico de postura e em aves no final da produção. As coletas também puderam ser definidas de acordo com as fases em que a aves são submetidas às condições mais estressantes da fase de produção. A linhagem das galinhas de postura comercial estudadas foi a Hy Line, e as idades das aves variavam de 17 a 110 semanas:

- 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.

As coletas foram efetuadas por galpão, seguidos ou alternados, nas granjas que possuíam mais de 20 galpões próximos. As aves foram avaliadas quanto aos sinais clínicos respiratórios e em seguida, foram eutanasiadas por deslocamento cervical de acordo com as normas do Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (CEUA- 204/11) e necropsiadas, comparando animais vacinados e não vacinados, com ou sem suspeita de LTI. À necropsia todos os órgãos foram avaliados

com relação à presença, característica e distribuição das lesões, sendo que sempre foram coletados encéfalo, gânglio trigêmeo, conchas nasais, conjuntiva, traqueia e pulmões para o exame histopatológico.

Durante as visitas a região da Mantiqueira foram coletadas 117 galinhas em maio de 2012 de diferentes granjas da região do surto, e 42 em abril 2013, além de 18 codornas em setembro de 2013. No total foram visitadas 17 granjas, com um total de 159 galinhas e 18 codornas (177 aves). A introdução da vacina vetorizada na região da serra da Mantiqueira, ocorreu de forma gradativa a partir de 2011 (autorização do MAPA). Dessa forma, as primeiras coletas em 2012, foram realizadas de forma que se obtivessem tanto galinhas vacinadas como não vacinadas, uma vez que aves mais velhas (em final de postura) ainda não haviam sido imunizadas para o GaHV-1. Assim, em 2012, 66 galinhas foram coletadas ainda sem vacinação e 51 já vacinadas. Em 2013, todas as 42 já haviam

sido imunizadas contra o vírus, totalizando 108 galinhas vacinadas. 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.

Este estudo compreendeu também o uso de quatro amostras já coletadas durante o ano de 2011, inclusive dos dados epidemiológicos, além de aves que morreram ou apresentaram sinais clínicos respiratórios durante os dois anos de vigência do projeto e que foram enviadas ao laboratório de patologia da UFMG pelos veterinários do IMA. Além disso, outras 18 galinhas (06 de cada surto) foram necropsiadas e o material coletado foi enviado ao nosso laboratório pelos veterinários do IMA, totalizando um total de 199 aves. Abaixo se encontra a tabela resumida de todas as amostras utilizadas no estudo.

**Tabela 1:** Quantitativo das amostras utilizadas no estudo e respectivas datas das coletas.

Período	Número de aves
2011	04 galinhas
Maio de 2012	117 galinhas
Agosto de 2012 (enviado pelo IMA)	06 galinhas
Outubro de 2012 (enviado pelo IMA)	06 galinhas
Abril de 2013	42 galinhas
Setembro de 2013 (enviado pelo IMA)	06 galinhas
Setembro de 2013	18 codornas
<b>Total</b>	<b>199 aves</b>

#### 4.4 Histopatologia

Amostras de laringe, traqueia, pulmões, conjuntiva, conchas nasais, encéfalo e gânglio trigêmeo de galinhas e codornas

foram coletadas e fixadas em formalina tamponada a 10%. Após 48h, as amostras foram transferidas para recipientes contendo álcool 70% até o processamento. Os tecidos foram desidratados em séries

crescentes de etanol, diafanizados em xilol, incluídos em parafina para a obtenção de cortes seriados à espessura de quatro micrômetros ( $\mu\text{m}$ ), 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 distal da traqueia foi cortada longitudinalmente a fim de possibilitar a identificação das porções no momento da análise ao microscópio. O diagnóstico histopatológico da LTI foi baseado na observação de lesões típicas associadas a corpúsculos de inclusão intranucleares.

#### 4.5 Extração de DNA

Para a extração de DNA foram coletadas amostras de traqueia e gânglio trigêmeo de galinhas e codornas, sob refrigeração. O método de extração foi baseado no uso do iodeto de sódio (NaI) e da sílica de acordo com Boom et al., (1990) e Volglstein e Gilles, (1979) com modificações.

Para as traqueias sob refrigeração, a mucosa foi raspada com o uso de um lâmina de bisturi 2.0 em uma placa de Petri de vidro, e, em seguida o material raspado (muco + mucosa) foi colocado em um microtubo de 1,5 mL. Foi adicionado ao conteúdo, 300 $\mu\text{l}$  de NaI que promovia a dissolução do tecido e rompimento da membrana celular. Para a adsorção do DNA em solução foi utilizado 40 $\mu\text{l}$  de sílica e em seguida prosseguia-se com uma série de lavagens com etanol (*etanol-wash*) e por fim acetona. O DNA extraído foi eluído em 40  $\mu\text{l}$  de TE (tris EDTA) e em seguida, analisado e quantificado pela medida de absorção atômica a 260 nm (nanômetros) em um espectrofotômetro (Nanodrop ND- 1000, Thermo Scientific, Wilmington, U.S.A.) e a pureza foi acessada usando a proporção 260-280 nm. O DNA quantificado variou de 70 ng a 2000ng para a extração de traqueias e entre 40 ng e 1550 ng para gânglios do nervo trigêmeo. A pureza ideal encontrava-se na faixa de 1,700 a 2,000, e variava de 1,400 a 3,200 entre as amostras. Posteriormente o DNA foi armazenado a -20°C.

Para os gânglios trigêmeos o mesmo procedimento foi adotado, porém após a adição de NaI, era procedida uma maceração dos tecidos com pistilos, para que houvesse o rompimento da membrana das células por ação mecânica dos pistilos associada com a ação química do NaI.

Para as amostras de 2011, foi extraído DNA a partir de material fixado em formol e já incluído em parafina. Para isso, foram seccionados em 20 a 40 cortes de cinco  $\mu\text{m}$  de espessura, colocados em microtubos de 1,5mL e deparafinizados 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®, onde foram seguidas as especificações do fabricante.

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

O DNA extraído foi submetido ao teste de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) utilizando-se *primers* específicos. Os nucleotídeos iniciadores utilizados para o gene ICP4 geraram um produto de 237 pares de base (Preis et al, 2013b). As reações da PCR foram realizadas de acordo com a recomendação do fabricante para um volume de 25  $\mu\text{l}$  (PCR Master mix promega), utilizando-se 200 ng de DNA da amostra e 0,02 nmol de *primer*. As condições para síntese de DNA foram: 94°C por 4 minutos, seguido de 35 ciclos 94°C por 20 segundos, 54°C por 40 segundos e 72°C por 1 minuto e uma extensão final de 72 °C por 5 minutos.

Para detecção de *Mycoplasma gallisepticum* foram utilizados *primers* recomendados pela OIE (OIE Terrestrial Manual 2008), gerando um produto de 185 pares de base. A PCR foi preparada com as seguintes condições para amplificação de DNA: 40 ciclos de 30 segundos a 94°C; 30 segundos a 55°C e 60 segundos a 72°C, e um ciclo final de 5 minutos a 72°C.

A detecção de *Mycoplasma synoviae* foi realizada de acordo com Lauerman et al., 1993, gerando um produto de 207 pares de base. Utilizou-se o seguinte programa para

amplificação: 5 minutos a 95°C para denaturação; 40 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C e 60 segundos a

72°C, com uma extensão final de 72°C por 5 minutos. Os *primers* utilizados em cada reação encontram-se resumidos na tabela 2.

**Tabela 2:** Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para PCR dos diferentes patógenos respiratórios: GaHV-1, *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae*.

Patógeno respiratório	Nome do primer	Sequência do primer (5'→3')	Tamanho do produto de PCR	Referência
GaHV-1	Foward	CCTTGGTTCGGGATGAAACC	237 pares de base	Preis et al., 2013b.
	Reverse	TTCATTACCTCCAGCGGTTC		
<i>Mycoplasma gallisepticum</i>	MG-14F	GAGCTAATCTGTAAAGTTGGTC	185 pares de base	OIE 1992.
	MG-13R	GCTTCCTTGCGGTTAGCAAC		
<i>Mycoplasma synoviae</i>	MS-1	GAAGCAAAATAGTGATATCA	207 pares de base	Lauerman et al., 1993.
	MS-2	GTCGTCTCCGAAGTTAACAA		

Como controle negativo da reação, foram utilizados os *primers* juntamente com o PCR Master Mix e água ultrapura, utilizado para permitir a identificação de possíveis contaminantes ou reações inespecíficas. Para controle interno (viabilidade e qualidade do DNA), as amostras negativas foram testadas por um oligonucleotídeo actina beta (gene de controle endógeno). As seguintes sequências de oligonucleotídeos foram utilizadas: (5' – AGAGGCTCCCCTGAACCCCAAAGC – 3') e (5' – CTGGATGGCTACATACATGGCTGG – 3'). As condições para síntese de DNA foram as mesmas já descritas por Ecco et al. (2011). Um controle positivo para ILTV foi utilizado a partir de uma amostra de campo positiva por PCR e confirmada por sequenciamento (Preis et al., 2013b).

Os produtos da PCR foram analisados 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.

## 4.7 Sequenciamento de DNA

### 4.7.1 Vírus da laringotraqueíte infecciosa (GaHV-1)

Um total de cinco amostras positivas para o vírus da laringotraqueíte infecciosa foram encaminhadas para sequenciamento dos genes ICP4 e TK. Duas amostras coletadas em 2012 e duas de 2013, além de outra amostra de 2011, coletada previamente (Preis et al, 2013b). As amostras foram enviadas ao Laboratório de Genética do Departamento de Zootecnia/Medicina

Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da UFMG para realização de sequenciamento de DNA. Dois µl do *amplicon* de cada amostra foram pipetados em microtubos de 500 µm juntamente com 0,5 µl (0,005 nmol) de cada *primer* (*foward* e *reverse* separadamente) e 5µl de água ultrapura, totalizando 7,5 µl em cada tubo.

A amplificação do gene ICP4 baseou-se na metodologia descrita por Chacon e Ferreira, (2009), amplificando dois fragmentos. Para a amplificação do primeiro fragmento, o *primer reverse* descrito foi pareado com um novo *primer foward* (3F) delineado para este estudo, amplificando um produto de 923 pares de base. Para o segundo fragmento foi delineado um novo *primer reverse* (3R) que foi pareado com o *primer* descrito por Chacon e Ferreira, 2009, para

amplificar um produto de 747 pares de base. As condições para síntese de DNA foram: 94°C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos 94°C por 1 minuto, 62°C por 1 minuto e 72°C por 1,5 minutos e uma extensão final de 72 °C por 10 minutos.

Os *primers* e condições da PCR para o gene TK foram os mesmos descritos por Han e Kim, (2001), sendo o *primer foward* descrito utilizado pareado com um novo *primer reverse* (TK-R) delineado para este estudo, gerando um produto de 783 pares de base. As condições para síntese de DNA foram: 95°C por 1 minuto, seguido de 30 ciclos 94°C por 1 minuto, 54°C por 45 segundos e 72°C por 2 minutos e uma extensão final de 72 °C por 10 minutos. Os *primers* utilizados neste estudo encontram-se resumidos na tabela 3.

**Tabela 3:** Sequências dos oligonucleotídeos utilizados para sequenciamento dos gene ICP4 e TK do GaHV-1.

Gene amplificado	Primer	Sequência do primer (5'→3')	Tamanho do produto de PCR	Referência
ICP4 (primeiro fragmento)	3F	ACTGATAGCTTTTCGTACAGCACG	923 pares de base	Chacon e Ferreira, 2009, com modificações
	R1	CATCGGGACATTCTCCAGGTAGCA		
ICP4 (segundo fragmento)	F2	CTTCAGACTCCAGCTCATCTG	747 pares de base	Chacon e Ferreira, 2009 com modificações
	3R	AGTCATGCGTCTATGGCGTTGAC		
TK	TKIP	CTTAGCGGAACCTATGCAAG	783 pares de base	Ham e Kim, 2001, com modificações
	TK-R	TAGCGTCTGGTCGATTGAAG		

Os produtos amplificados de DNA foram extraídos e purificados da agarose com um kit (Invisorb® Spin DNA *Extraction Kit*), conforme recomendações dadas pelo fabricante. Cada amostra foi sequenciada três vezes, nas direções *forward* e *reverse*, pelo método Sanger por eletroforese capilar utilizando um kit (ABI Taq DyeDeoxy Terminator versão 3.1 *Cycle Sequencing Kit*) de acordo com as instruções do fabricante (*Applied Biosystems, Inc.*, Foster City, California, USA) em um sequenciador automático (ABI 3130 Genetic Analyzer).

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 KGaA, Darmstadt, Alemanha), centrifugou-se a 14.000 rpm por 10 minutos e o precipitado foi secado na estufa a 95°C por 5 minutos.

Com o uso do programa (*software*) SeqScap (versão 2.5), as sequências obtidas foram analisadas, e sequências consenso foram criadas. O programa Mega (versão 5.0) foi utilizado no alinhamento com sequências depositadas no *GenBank* database (NCBI) através da plataforma BLASTn. As árvores filogenéticas foram geradas pelo método *neighbour-joining* com *bootstrap* 1000, Kimura 2 parâmetros.

#### 4.7.2 *Mycoplasma gallisepticum*

Um total de sete amostras positivas para *Mycoplasma gallisepticum* foram encaminhadas para sequenciamento dos genes IGSR e *mgc2*. Das amostras sequenciadas, três foram coletadas de estudos anteriores, em 2011, uma amostra coletada em 2012 e duas de 2013, além de uma amostra vacinal (MG-70, BIOVET®). As amostras foram enviadas ao Laboratório de Genética do Departamento de Zootecnia/Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da UFMG para realização de sequenciamento de DNA. 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.

Para a amplificação do gene IGSR baseou-se na metodologia descrita por Raviv et al., (2007), gerando um produto de 812 pares de base. As condições para síntese de DNA foram: 94°C por 3 minutos, seguido de 30 ciclos 94°C por 20 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto e uma extensão final de 72 °C por 5 minutos. Os primers e condições da PCR para o gene *mgc2* foram os mesmos descritos por Ferguson et al., (2005), gerando um produto de 824 pares de base. As condições para síntese de DNA foram: 94°C por 3 minutos, seguido de 40 ciclos 94°C por 20 segundos, 57°C por 40 segundos e 72°C por 1 minuto e uma extensão final de 72 °C por 5 minutos. Os primers utilizados neste estudo encontram-se resumidos na tabela 4.

**Tabela 4:** Sequências dos oligonucleotídeos utilizados para sequenciamento dos gene IGSR e *mgc2* do *Mycoplasma gallisepticum*.

Gene amplificado	Primer	Sequência do primer (5'→3')	Tamanho do produto de PCR	Referência
IGSR	IGSR F	ACTGATAGCTTTTCGTACAGCACG	812 pares de base	Raviv et al, 2007
	IGSR R	CATCGGGACATTCTCCAGGTAGCA		
<i>mgc2</i>	<i>mgc2</i> 1R	GCTTTGTGTTTCTCGGGTGCTA	824 pares de base	Ferguson et al., 2005
	<i>mgc2</i> 1R	CGGTGGAAAACCAGCTCTTG		

Os produtos amplificados de DNA foram extraídos e purificados da agarose com um kit (Invisorb® Spin DNA *Extraction Kit*) conforme recomendações dadas pelo fabricante. Cada amostra foi sequenciada três vezes, nas direções *forward* e *reverse*, pelo método Sanger por eletroforese capilar utilizando um kit (ABI *Taq DyeDeoxy Terminator* versão 3.1 *Cycle Sequencing Kit*) de acordo com as instruções do fabricante (*Applied Biosystems, Inc.*, Foster City, California, USA) em um sequenciador automático (ABI 3130 *Genetic Analyzer*).

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 KGaA, Darmstadt, Alemanha), centrifugou-se a 14.000 rpm por 10 minutos e o precipitado foi secado na estufa a 95°C por 5 minutos.

Com o uso do programa (*software*) *SeqScap* (versão 2.5), as sequências obtidas foram analisadas, e sequências consenso foram criadas. O programa *Mega* (versão 5.0) foi utilizado no alinhamento com sequências depositadas no *genbank* database (NCBI) através da plataforma BLASTn. As árvores filogenéticas foram geradas pelo método

*neighbour-joining* com *bootstrap* 1000, Kimura 2 parâmetros.

#### 4.8 Números de acesso das sequências de nucleotídeos

##### 4.8.1 Vírus da laringotraqueíte infecciosa

As seguintes sequências publicadas no *Genbank* foram utilizadas para o gene ICP4: V1-99 (número de acesso: JX (646898); estirpe CL9 (JN804827); estirpe vacinal CEO (EU104900); CEO vacina Laryngo-Vac (FJ477350); CEO vacina Nobilis-ILT (FJ477351); WangGang (DQ995291); estirpe LJS09 (JX458822); vacina TCO (EU104908); vacina TCO LTI-IVAX (FJ477349); USP-81 (FJ794469); 12/D/02/BCK ICP4 (EU104911); 25/H/88/BCK ICP4 (EU104899); 24/H/91/BCK ICP4 (EU104910); 13/E/03/BBR ICP4 (EU104907); 14/E/03/BBR ICP4 (EU104906); 2/A/04/BR ICP4 (EU104912); 63140/C/08/BR (JN542536); referência USDA (JN542534); estirpe 1874C5 (JN54253); estirpe 81658 (JN542535); USP-01 (FJ477352); USP-02 (FJ477353); USP-07 (GQ499345); USP-09 (FJ477357); USP-06 (FJ477356); USP-27 (FJ477365); USP-74 (FJ794467).

As seguintes sequências foram utilizadas para o gene TK: LTI-IVAX (número de acesso: FJ444832); USP-57 (FJ444847); vacina CEO - Merial® (HM230801); CG (DQ522949); Samberg (DQ522947); V1-99 (JX646898); CL9 (JN804827); LJS09 (JX458822); 63140/C/08/BR (JN542536);



referência USDA (JN542534); 1874C5 (JN542533); 81658 (JN542535); *Gallid herpesvirus 1*(NC\_006623); 288269/2007 (HM230794); CH04 (EU360946); SP-Trachivax (EU423897); vacina TCO (EU360950); ILACPTK (D00565); estirpe 632 (S83714); USP-01 (FJ444833); USP-02 (FJ444834); USP-07 (GQ499341); USP-09 (FJ444836); USP-27 (DQ786401); (UL23) gene (AF435453); estirpe CH04 (EU360946).

#### 4.8.2 *Mycoplasma gallisepticum*

As seguintes sequências publicadas no *Genbank* foram utilizadas para o gene IGSR: COL/68938/CK08 (KC247840); ECU/77025/CK09(KC247842); GUA/79672/CK09 (KC247844); PAN/68630/CK08 (KC247845); VEN/69993/CK08 (KC247847); USA/K6001B/CK07 (KC247849); USA/65099/PF08 (KC247850); EGY/67240/CK08 (HQ143380); ISR/K3868/CK95 (HQ143384); JOR/111/CK09 (KC247857); SPA/5742-3/CK09 (KC247858); IND/38825/CK05 (KC247859); THA/3/CK08 (KC247860); RSA/22/CK10 (KC247830); RSA/66/CK12 (KC247831); USA/F/CK58 (HQ143383); ts-11 (KC247864); 6/85 (KC247865).

As seguintes sequências publicadas no *Genbank* foram utilizadas para o gene *mgc2*: COL/68938/CK08 (KC247873); ECU/77025/CK09 (KC247875); GUA/79672/CK09 (KC247877); PAN/68630/CK08 (KC247878); VEN/69993/CK08 (KC247880); USA/K6001B/CK07 (KC247882); USA/65099/PF08 (KC247883); EGY/67240/CK08 (HQ143372); ISR/K3868/CK95 (HQ143377); JOR/111/CK09 (KC247890); SPA/5742-3/CK09 (KC247891); IND/38825/CK05 (KC247892); THA/3/CK08 (KC247893); RSA/22/CK10 (KC247866); RSA/66/CK12 (KC247868); USA/F/CK58 (KC247897); ts-11 (KC247898); 6/85 (KC247899).

#### 4.9 Estudo epidemiológico

Os proprietários das granjas em que foram coletados materiais responderam a um questionário epidemiológico incluindo

questões como: número total de aves da granja, número de galpões, número de aves por galpão, sinais clínicos observados, taxa de mortalidade, vacinações utilizadas, medicamentos administrados, entre outros. O questionário epidemiológico encontra-se no anexo I.

#### 4.10 Análise estatística

Resultados positivos ou negativos pela PCR para o GaHV-1 foram comparados utilizando aves vacinadas e não vacinadas com as vacinas vectoradas. Para isso foi utilizado o teste não paramétrico de Qui-quadrado, indicado para comparar as frequências observadas (F0) com as frequências esperadas (Fe).

### 5. Resultados

#### 5.1 Epidemiologia

No total, 17 granjas de postura comercial envolvidas no surto de LTI em novembro de 2010, foram incluídas neste estudo. Segundo os proprietários e responsáveis técnicos das granjas, não foi registrado aumento de mortalidade e queda na produção de ovos pelas aves que receberam as vacinas vectoradas durante os anos de 2012 e 2013.

Durante as visitas, observou-se falha na biossegurança em algumas granjas, pois outros tipos de aves, como garças e pardais, até mesmo mamíferos como gatos, tinham acesso às instalações. Outro ponto observado foi que em duas granjas, os galpões com as aves em postura, encontravam-se muito próximos de rodovias, onde caminhões com excretas de aves, ou que destinam aves de descarte ao abate, passavam muito próximos, podendo veicular possíveis agentes infecciosos. Além disso, muitas granjas encontravam-se muito próximas umas das outras, podendo haver disseminação de agentes infecciosos entre elas.

A vacinação para LTI (FPV/LT- *Fowl Poxvirus laryngotracheitis* e HVT/LT- *Turkey Herpesvirus laryngotracheitis*) começou a ser utilizada por granjas da

região em agosto de 2011, sendo que a introdução de aves vacinadas ocorreu gradativamente devido ao ciclo longo de produção das galinhas poedeiras. Algumas granjas optaram inicialmente por receber aves vacinadas no incubatório (HVT/LTI) e uma das maiores granjas da região padronizou a vacinação em aves com 26 a 28 dias de idade (FPV/LTI). Outras granjas administravam a vacina em aves com 35 dias de idade. Durante o período de agosto de 2011 a fevereiro de 2013 coexistiam nas granjas lotes vacinados (aves mais jovens) e lotes não vacinados (aves mais velhas). Após esse período, os produtores procuraram manter todas as aves vacinadas, com exceção de duas granjas. No entanto, ainda não havia uniformidade com relação à idade da administração da vacina FPV/LTI. Uma das granjas avaliou a administração da FPV/LTI aos 21, 23, 26, 28 e 30 dias de idade, obtendo melhor resposta (baseada na “pega”- reação cutânea devido à replicação do Poxvirus aviário no epitélio) aos 26 dias de idade. Posteriormente, a mesma granja adotou a dupla vacinação (incubatório e aos

26-28 dias de idade) e aparentemente obteve melhores resultados no controle da doença. A partir de 2014 a vacinação será compulsória para todas as granjas da região.

Outro fato que merece atenção é a existência de numerosas galinhas de subsistência na periferia das granjas. Trabalhos anteriores (Preis, 2013a), diagnosticaram algumas dessas aves como positivas para a LTI.

Além da vacinação para LTI, as granjas da região também possuem periodicidade na imunização contra os seguintes agentes infecciosos:; vírus da doença de Newcastle; vírus da bronquite infecciosa aviária; pneumovírus aviário; *Avibacterium paragallinarum* (coriza infecciosa); *Mycoplasma gallisepticum*; vírus da doença de Gumboro; e vírus da bouba aviária (poxvírus). A tabela 5 e 6 contém as vacinas administradas às aves juntamente com a idade em duas granjas com maior população de galinhas de postura.

**Tabela 5:** Esquema de vacinação granja 1.

<b>Doença</b>	<b>Idade (dias)</b>	<b>Estirpe vacinal - nome comercial</b>	<b>Via de administração</b>
Marek - Bouba	1	HVT + RISPENS – bouba suave	Incubatório
Pneumovirose	1	SHS 119 BR (galinha) + TRTV (Peru)	Spray
Bronquite - Newcastle	7	Massachussets H120 – HB1	Spray ou água
Gumboro	14	Mouthrop G 603	Água
Gumboro	21	Mouthrop G 603	Água
Gumboro	28	Mouthrop G 603	Água
Bronquite - Newcastle	28	Massachussets H120 – La sota	Spray ou água
Laringotraqueite	35	FPV-LTI	Membrana da asa
Gumboro	35	Mouthrop G 603	Água
Coriza	40	Sorotipo A (cepa 221), Sorotipo B (cepa 222), Sorotipo C (cepa modesto)	Intramuscular
Micoplasmose	40	MG 70	Ocular
Pneumovirose	55	SHS 119 BR (galinha) + TRTV (Peru)	Spray
Bouba	65	Bouba forte	Membrana da asa
Encefalomielite	65		Água
Bronquite - Newcastle	65	Massachussets H120 – La sota	Spray ou água
Newcastle, Bronquite infecciosa, EDS, Coriza	95	La sota, Massachussets H120, EDS 76 Sorotipo A (cepa 221), Sorotipo B (cepa 222), Sorotipo C (cepa modesto)	Intramuscular
Bronquite	100	Massachussets H120	Spray

**Tabela 6:** Esquema de vacinação granja 2.

<b>Doença</b>	<b>Idade (dias)</b>	<b>Estirpe vacinal – nome comercial</b>	<b>Via de administração</b>
Marek + Laringotraqueíte	1	HVT-LTI	Incubatório
Pneumovirose	1	Nobilis Rhinno CV	Spray (gota grossa)
Bronquite + Newcastle	7	Nobilis IB + ND MA5 + Clone 30	Água
Gumboro	14	Nobilis Gumboro 228 E	Água
Gumboro	21	Nobilis Gumboro 228 E	Água
Gumboro	28	Nobilis Gumboro 228 E	Água
Gumboro	35	Nobilis Gumboro d78	Spray
Bronquite + Newcastle	35	Nobilis IB + ND MA5 + Clone 30	Spray (gota grossa)
Coriza	35	Nobilis coriza AQ	Peito
Micoplasmose	40	F vax (MG)	Spray (gota fina)
Bouba + Encefalomielite	56	Bouba forte (AE-POX Nobilis)	Asa
Bronquite + Newcastle	84	Nobilis IB + ND MA5 + Clone 30	Spray (gota grossa)
Bronquite + Newcastle + EDS + Coriza + Pneumovirose	105	COR 4 + TRT INAC	Peito

As aves utilizadas de estudos anteriores (2011) eram providas de Pedralva, município localizado a aproximadamente 160 km de Itamonte. Na granja deste município era feito um programa de vacinação diferente dos apresentados nas tabelas 5 e 6, sendo que as aves não eram vacinadas para LTI, e também não era feita vacinação para micoplasmose.

## 5.2 Sinais clínicos

As galinhas de postura comercial avaliadas não apresentaram sinais clínicos respiratórios durante as visitas programadas às granjas, diferentemente dos casos relatados em agosto e outubro de 2012 e setembro de 2013. Aproximadamente 3% das aves de galpões com 25 a 33 mil galinhas apresentaram sinais clínicos respiratórios como tosse e espirros, além de

estertores respiratórios. Segundo relato dos veterinários do IMA, as galinhas apresentaram dificuldade respiratória, manchas de sangue nas penas e permaneciam com o bico aberto. Foram observados também apatia e cianose.

## 5.3 Lesões macroscópicas

Durante as visitas programadas às granjas, foram realizadas 159 necropsias nas galinhas de postura comercial, que não revelaram lesões sugestivas ou compatíveis com infecção pelo GaHV-1. Nas aves (necropsiadas durante o ano de 2012), uma das principais lesões observadas foi a hiperemia da mucosa da traqueia associada ao acúmulo de muco, caracterizando uma traqueíte aguda difusa leve. Nos seios nasais foi observado exsudato que variava

de mucoso a caseoso, além de opacidade dos sacos aéreos, e por vezes, com aderências aos pulmões. Na grande maioria das aves (120 – 75%), principalmente nas que se encontravam em pico de postura, era observado um amarelamento difuso intenso no fígado. Foram identificados ainda ectoparasitas como piolhos da ordem Phthiraptera, e do gênero *Menacanthus* e ácaros do gênero *Megninia*, que levavam a uma dermatite focal leve, além de endoparasitas como o cestódeo do gênero *Raillietina*, observados no intestino delgado, e nematódeos como *Heterakis gallinarum* no ceco.

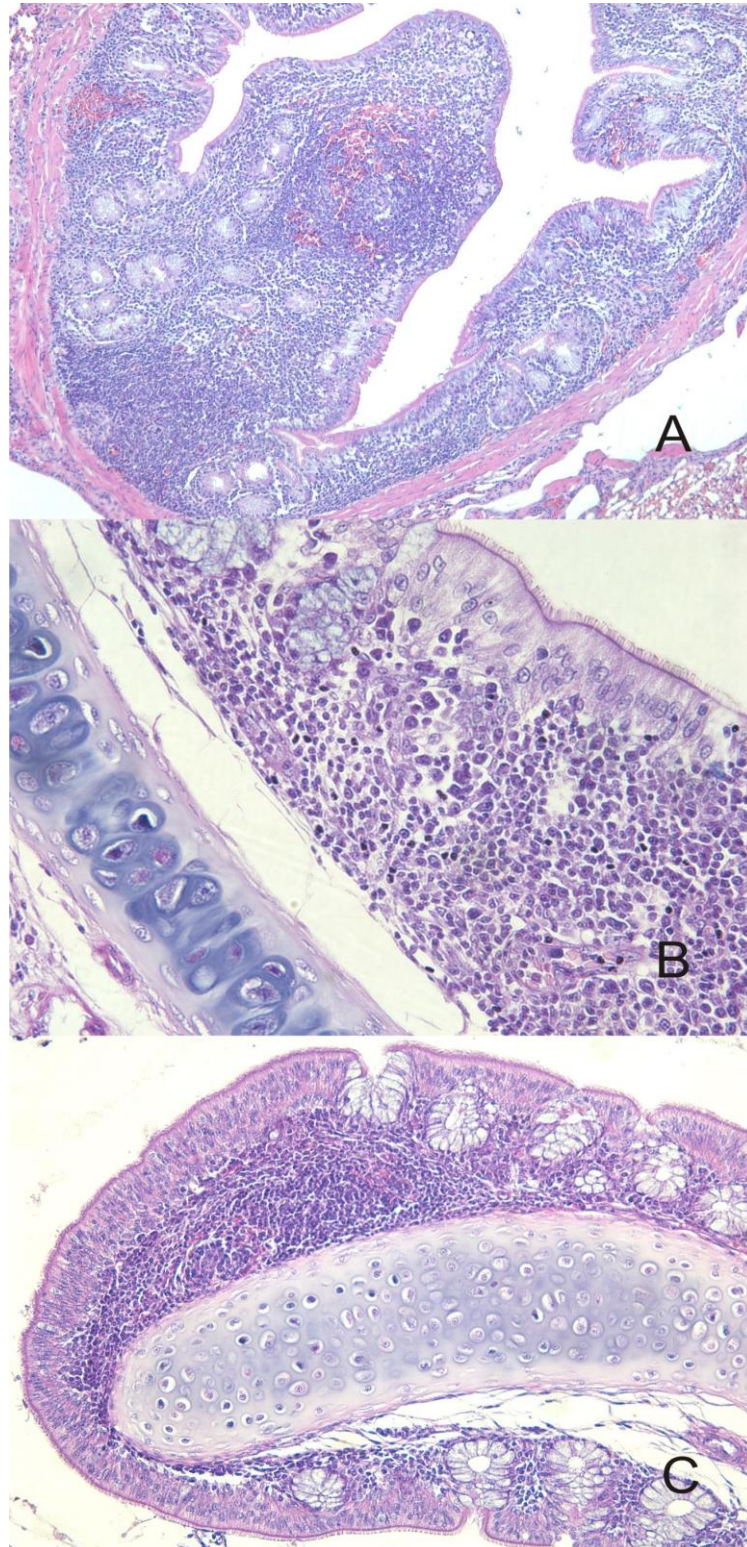
Das 18 aves não vacinadas que corresponderam aos episódios de mortalidade cursando com sinais respiratórios severos, encaminhadas pelos veterinários do IMA ao setor de patologia veterinária da UFMG, 15 apresentaram lesões típicas da LTI. Várias traqueias apresentaram a mucosa moderadamente espessada 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 quatro 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. Nas conchas, seios nasais e seios paranasais, observou-se acúmulo de muco, por vezes sanguinolento, associado à hiperemia, caracterizando rinite/sinusite aguda moderada. Em 10 seios nasais e paranasais, observou-se acúmulo de material fibrinoso branco-amarelado em

moderada quantidade, caracterizando uma rinite/traqueíte fibrinonecrotica aguda difusa moderada. Duas aves apresentaram também exsudato caseoso nos pulmões que obstruía os bronquios.

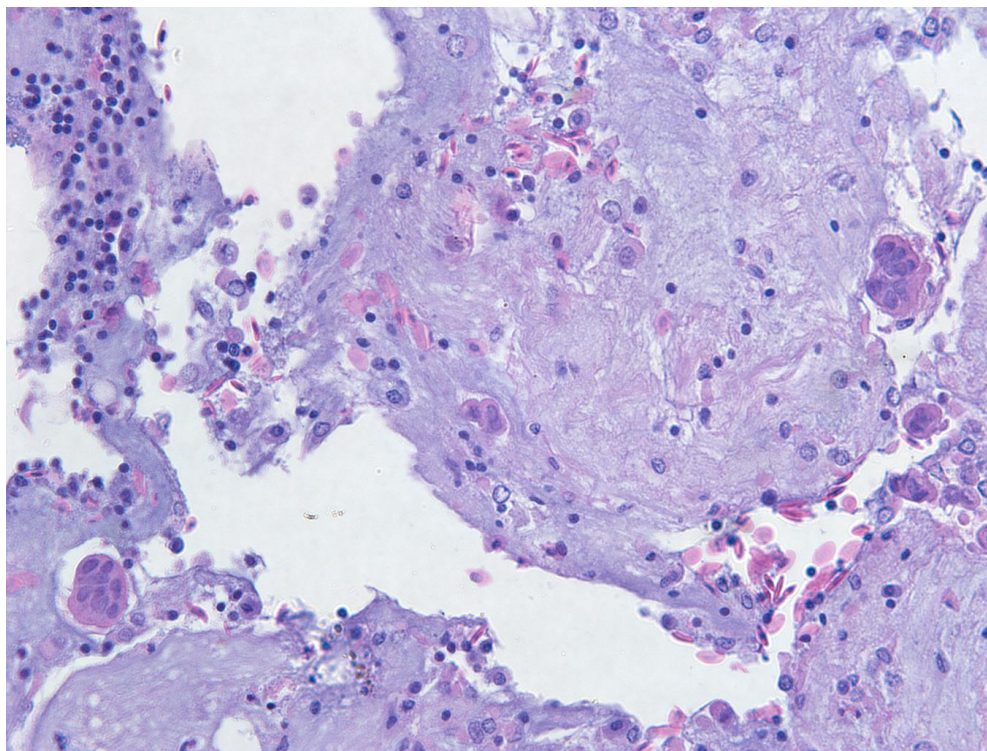
## 5.4 Histopatologia

### 5.4.1 Laringotraqueíte infecciosa aviária

Nas laringes e traqueias de 151 (95%) das 159 galinhas necropsiadas nas visitas às granjas, observaram-se infiltrado linfoplasmocitário na lâmina própria levando ao espessamento da mucosa. A distribuição e a intensidade do infiltrado eram variáveis entre as aves: difuso ou multifocal e também formando agregados linfóides, discreto a intenso. Em várias laringes e traqueias, as glândulas mucosas não eram mais observadas, pois eram substituídas pelo infiltrado inflamatório acentuado. Essas alterações prevaleceram na laringe e parte cranial da traqueia em relação a parte distal, e foram consideradas não características para a LTI (lesões inespecíficas), (Figura 4), excetuando-se de quatro galinhas (coletadas em maio de 2012), onde observou-se lesão sugestiva de LTI. Nestas aves, as lesões foram caracterizadas por descamação do epitélio, além de projeção e fusão de células epiteliais formando sincícios de 40 a 90 µm de diâmetro, porém não contendo corpúsculo de inclusão intranuclear, característico da LTI (Figura 5). Em 71 das 159 aves (45%), havia intensa diferenciação linfoplasmocitária, caracterizando um infiltrado inflamatório predominantemente plasmocitário com presença de células com corpúsculos de Russel (células Mott).



**Figura 4:** Galinha de postura com alterações consideradas inespecíficas. A: Pulmão (brônquio principal) apresentando infiltrado inflamatório linfocitário intenso expandindo a lamina própria. O epitélio respiratório permanece íntegro. H&E 100x. B: Traqueia apresentando infiltrado inflamatório linfocitário moderado expandindo a lamina própria. O epitélio respiratório permanece íntegro. H&E 400x. C: Concha nasal apresentando infiltrado inflamatório linfocitário moderado expandindo a lâmina própria. O epitélio respiratório permanece íntegro. H&E 400x.

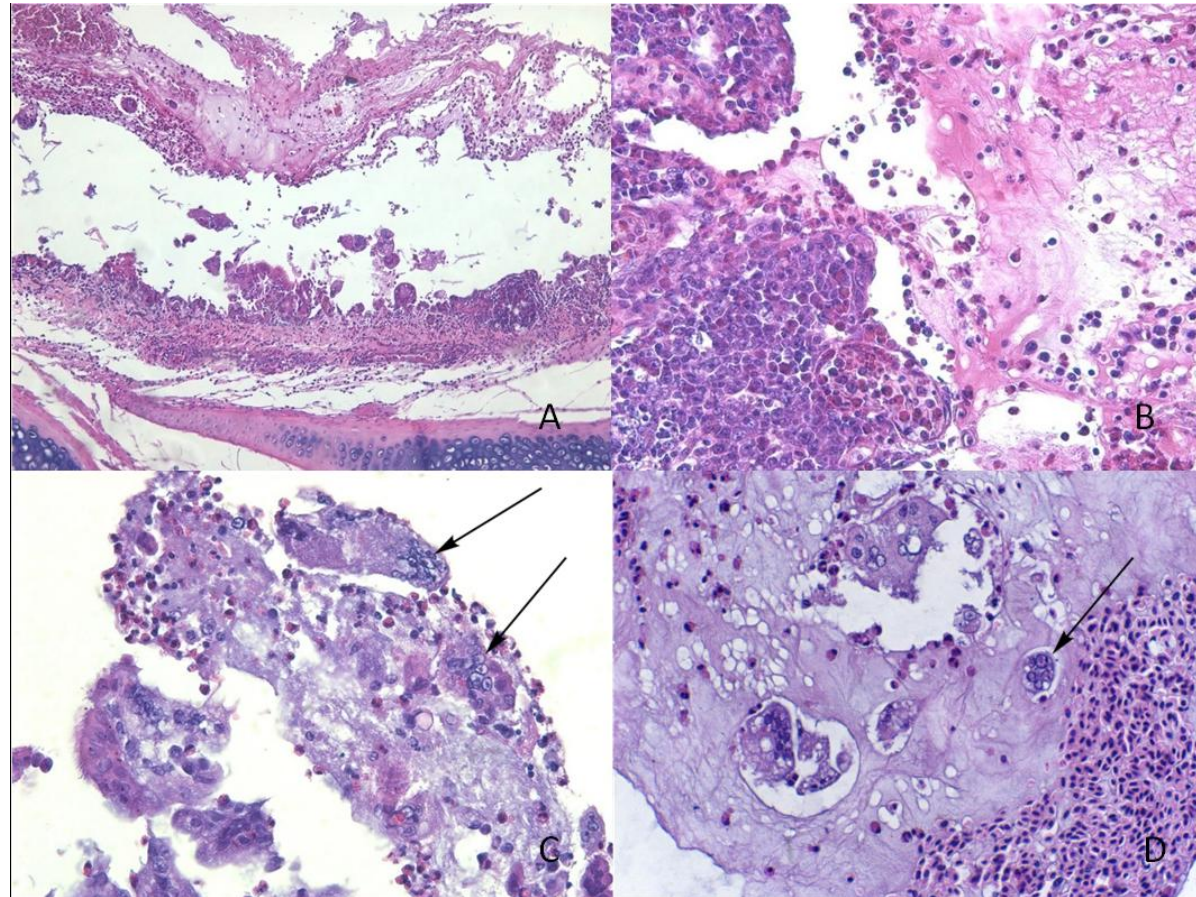


**Figura 5:** Galinha de postura com lesões sugestivas de LTI. A: Lúmen de traqueia apresentando algumas células inflamatórias (linfócitos e plasmócitos), hemácias e fibrina acompanhadas de células sinciciais onde corpúsculos de inclusão não são observados. H&E 200x.

Nas conchas nasais e seios paranasais, 129/159 (81%) galinhas apresentaram infiltrado linfoplasmocitário na lâmina própria levando ao espessamento da mucosa assim como observado na laringe e traqueia. A distribuição e a intensidade do infiltrado também variaram, conforme descrito anteriormente. Nos pulmões, 71 de 159 galinhas (45%) apresentaram infiltrado linfoplasmocitário na lâmina própria de brônquios principais e mesobrônquios e 16/159 (10%) hiperplasia do BALT. Na conjuntiva, 12/159 (7%) galinhas apresentaram infiltrado linfoplasmocitário difuso na lâmina própria e também formando agregados, além de exocitose de heterófilos. Não foram observadas alterações no encéfalo e no gânglio trigêmeo.

Das aves enviadas ao laboratório pelo IMA, 16/18 (89%) apresentavam lesões características da LTI. Observaram-se laringite e traqueíte fibrino-necrótica

caracterizadas por hiperemia e infiltrado linfoplasmocitário na lâmina própria levando ao espessamento da mucosa, que variava de moderado a intenso e de distribuição difusa (figura 6A). Em algumas galinhas o infiltrado também era heterofílico, onde observa-se exocitose de heterófilos e algumas hemácias. Além disso, havia presença de lâminas de fibrina aderidas à superfície do epitélio e no lúmen em associação a grande quantidade de células inflamatórias - linfócitos e plasmócitos (Figura 6 B) . Havia perda das glândulas mucosas e descamação das células epiteliais que se fusionavam formando células sinciciais. As células sinciciais possuíam de 10 a 50 núcleos (Figura 6C e D), e quase todos estavam preenchidos por um material denso basofílico e/ou eosinofílico com um halo ao redor. Duas aves apresentaram lesões histopatológicas inespecíficas, que não puderam ser correlacionadas a LTI.



**Figura 6:** Galinha de postura naturalmente infectada pelo GaHV-1. A: Traqueia apresentando infiltrado inflamatório linfocitário moderado expandindo a lamina própria, com necrose do epitélio, descamação e exsudação de fibrina cobrindo a mucosa. H&E 100x. B: Laringe apresentando grande quantidade de células inflamatórias (linfócitos, plasmócitos e alguns heterófilos) associadas a intensa quantidade fibrina e hemácias no lúmen H&E 400x. C: Traqueia apresentando células sinciciais contendo corpúsculos de inclusão intranuclear que variavam de anofílicos a eosinofílicos (seta) descamando para o lumen. D: Lumen da traqueia com hemácias, fibrina e células sinciciais em degeneração . H&E 400x.

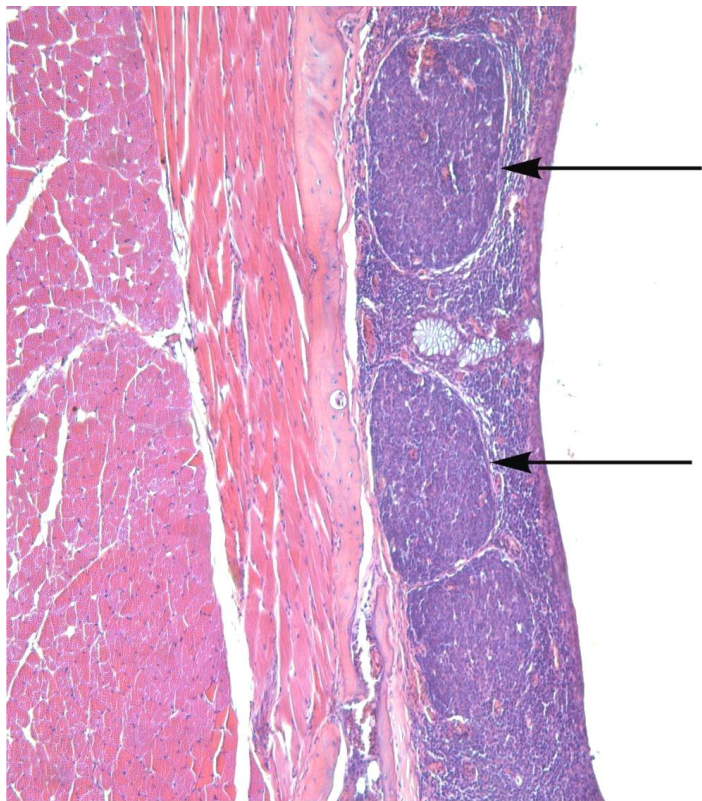


Os diagnósticos histopatológicos das traqueias das 177 aves analisadas, correlacionado a possível conclusão diagnóstica, encontram-se na tabela no anexo I.

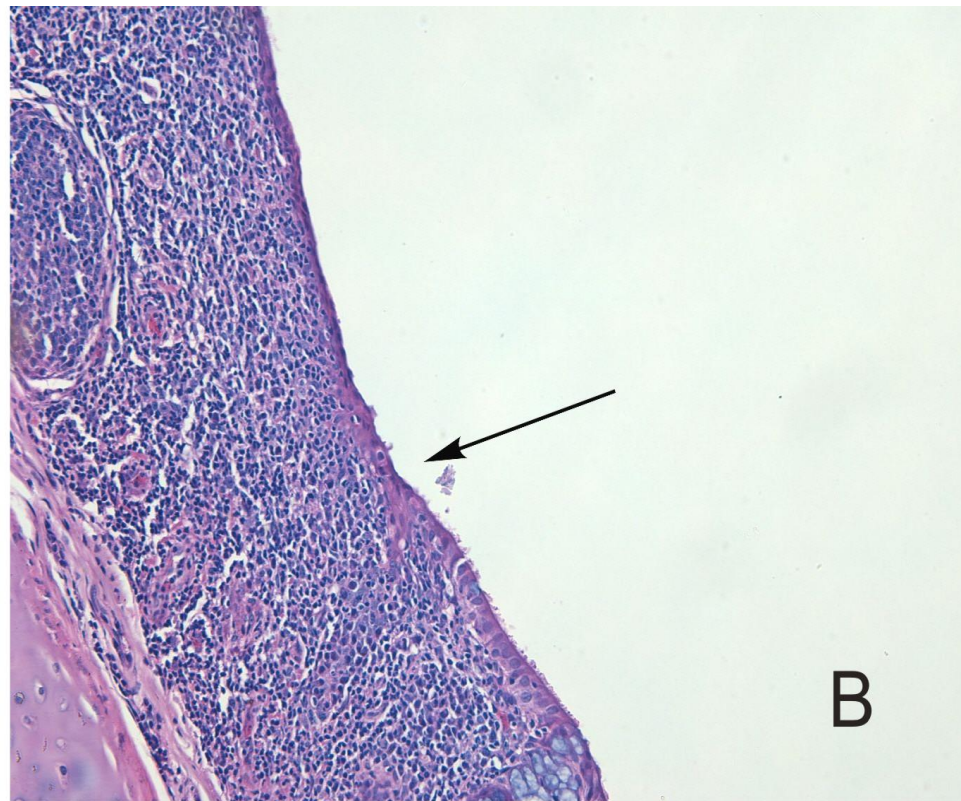
#### **5.4.2 Diagnóstico diferencial**

Pela análise histopatológica das galinhas amostradas em 2012 e 2013, observaram-se também lesões sugestivas de outras doenças respiratórias nas galinhas de postura comercial. Das 159 galinhas de postura comercial, 41 (26%) apresentaram lesões sugestivas de micoplasmose, caracterizadas

como espessamento difuso e acentuado da mucosa da laringe, traqueia, conchas e seios paranasais por infiltrado linfocitário em arranjo linfocelular (Figura 7A). Observaram-se também alterações no epitélio desses tecidos, como substituição do epitélio respiratório normal por um epitélio simples não ciliado e achatado. O epitélio ciliar apresentava ausência dos cílios de forma multifocal a coalescente ou difusamente (Figura 7B). Essas aves apresentaram conjuntamente hiperplasia dos tecidos linfóides presentes na conjuntiva e nos pulmões.



A

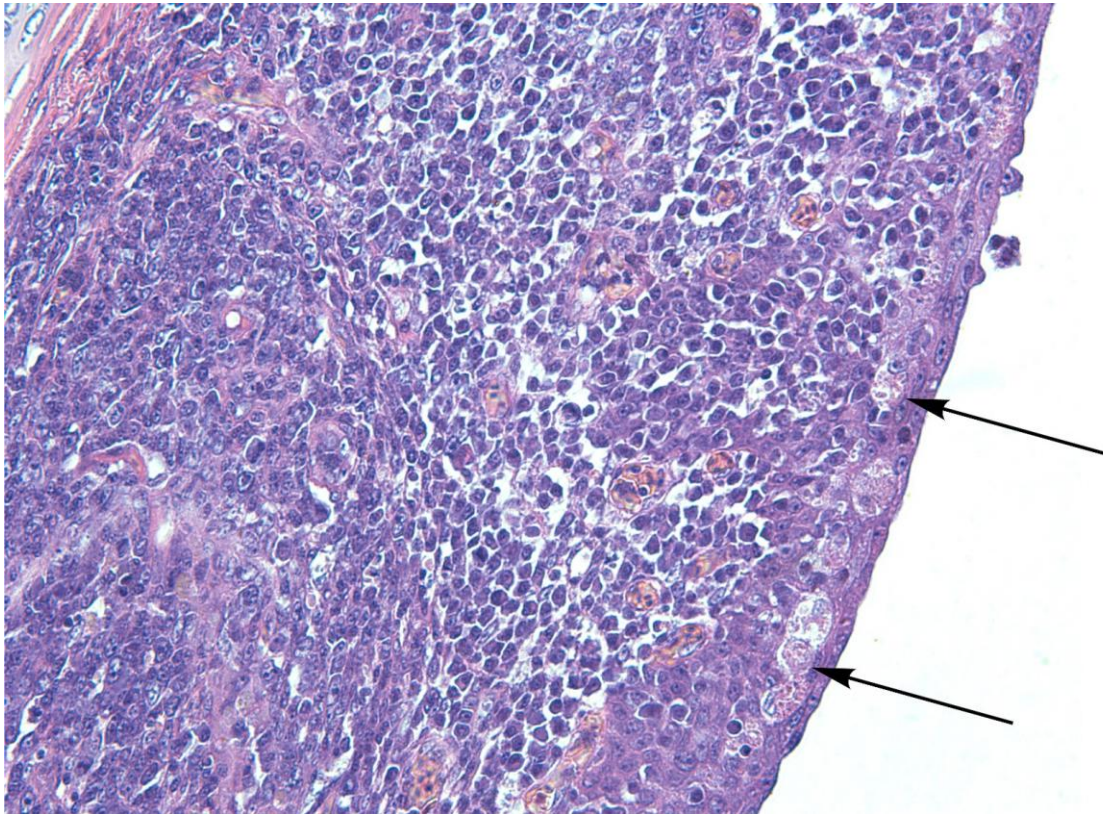


B

**Figura 7:** Galinha de postura naturalmente infectada por *Mycoplasma* spp. A: Traqueia apresentando espessamento difuso e acentuado caracterizado por infiltrado linfocitário em arranjo linfocitário (seta). H&E 200x. B: Traqueia apresentando substituição do epitélio respiratório normal por epitélio simples não ciliado e achatado (seta na área de transição). H&E 400x.

Em seis aves (4%) das 159 havia lesões sugestivas de bronquite infecciosa, caracterizadas pelo espessamento da mucosa da laringe e traqueia por um

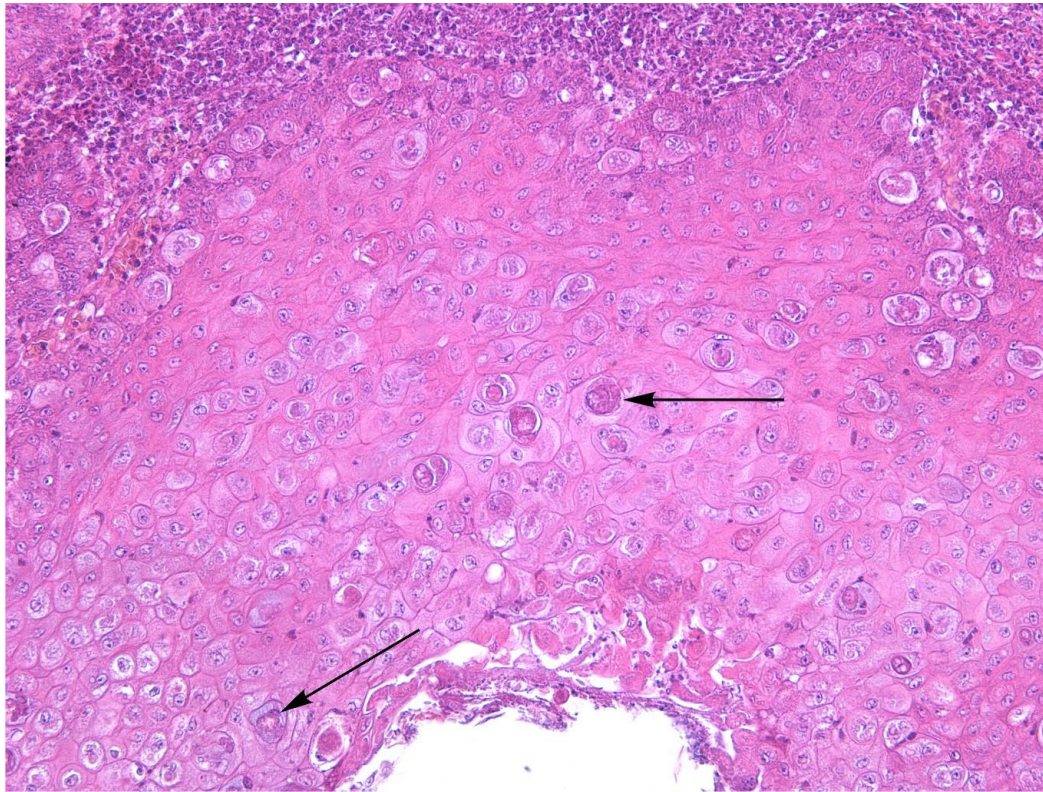
infiltrado linfocitário e heterofílico difuso acentuado. No epitélio desses tecidos havia perda dos cílios e necrose individual de células (Figura 8).



**Figura 8:** Galinha de postura naturalmente infectada pelo vírus da bronquite infecciosa (IBV). Traqueia apresentando infiltrado inflamatório linfocitário difuso acentuado expandindo a lamina própria. No epitélio havia perda dos cílios e necrose individual de células (setas). H&E 400x.

Em uma ave (1%), observou-se rinite e traqueíte linfoplasmocitária associada a hiperplasia e metaplasia escamosa do epitélio de revestimento associado a numerosos corpúsculos de inclusão

eosinofílicos intracitoplasmáticos em células epiteliais (Figura 9), tratando-se de uma infecção pelo vírus da bouba aviária (poxvírus aviário).



**Figura 9:** Galinha de postura naturalmente infectada pelo vírus da bouba aviária (poxvírus). A: Concha nasal apresentando hiperplasia do epitélio de revestimento associado a numerosos corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos eosinofílicos em células epiteliais (setas). H&E 200x.

O trabalho também envolveu aves do primeiro semestre do ano de 2011, provenientes de uma granja de recria (Pedralva, MG). Foram analisadas aves introduzidas em uma das granjas de postura de Passa Quatro sem vacinação para micoplasmose. De quatro aves estudadas, três apresentaram lesões típicas de micoplasmose e uma apresentou lesão típica de LTI, conforme descrito anteriormente.

### 5.5 Codornas

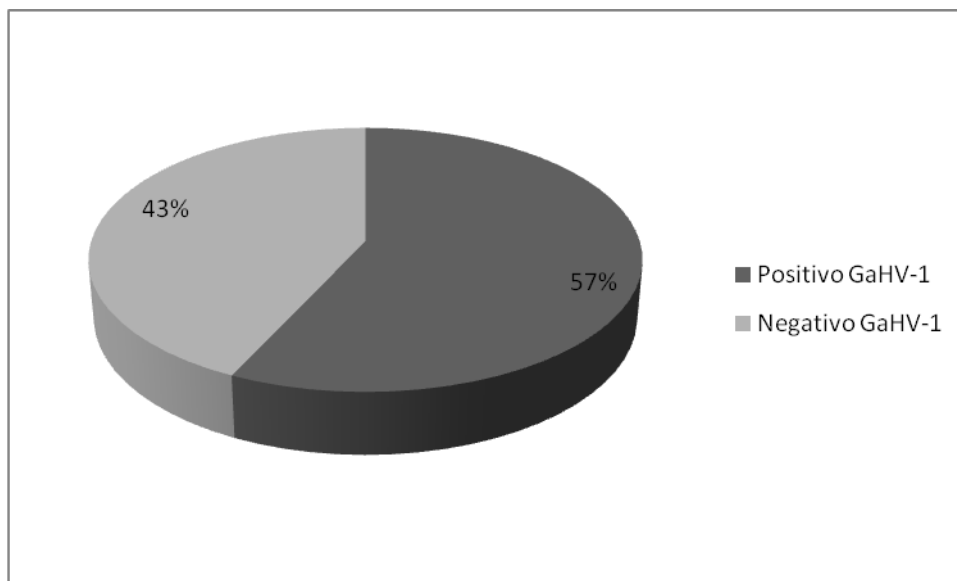
A análise macroscópica e histopatológica dos órgãos das 18 codornas não revelou lesões nos tecidos analisados. Com exceção de uma ave, que apresentava laringite e traqueíte linfocitária difusa moderada à histopatologia. O epitélio da laringe e da

traqueia apresentava perda de cílios multifocal e achatamento do epitélio, sendo que a lesão observada foi considerada inespecífica.

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

#### 5.6.1 Laringotraqueíte infecciosa aviária

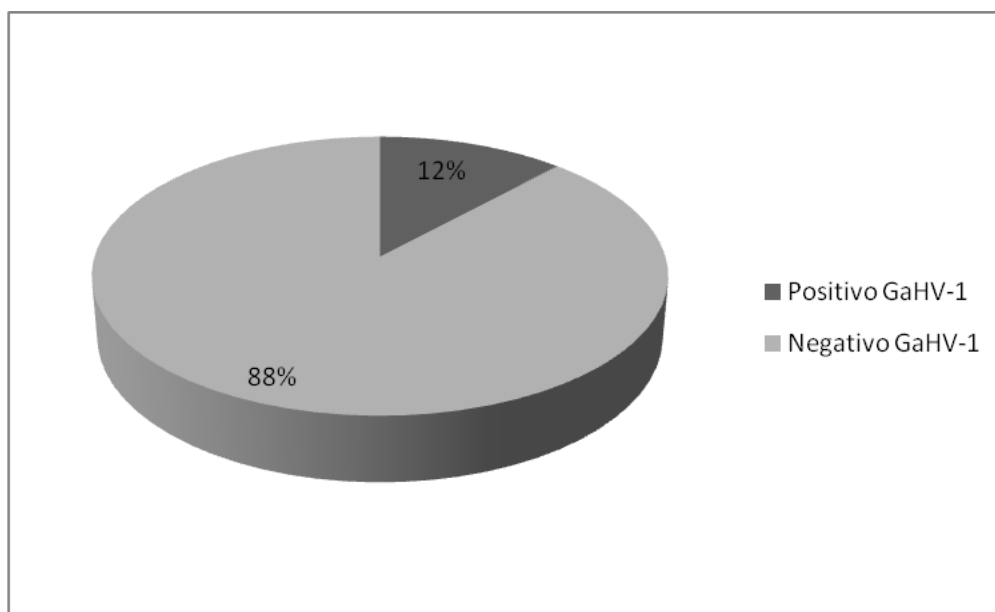
Das 117 amostras de traqueia de galinhas de postura, coletadas em maio de 2012 e submetidas à PCR, 66 (57%) apresentaram um produto esperado de 237 pares de base (figura 12), portanto sendo positivas para o GaHV-1 (Figura 10). Entretanto, todos os gânglios do nervo trigêmeo testados obtiveram um resultado negativo.



**Figura 10:** Quantitativo de galinhas positivas pela PCR para o GaHV-1 no ano de 2012.

Considerando-se as 42 amostras de traqueia coletadas em abril de 2013 e submetidas à PCR, apenas cinco (12%) foram positivas para o GaHV-1 (Figura 11).

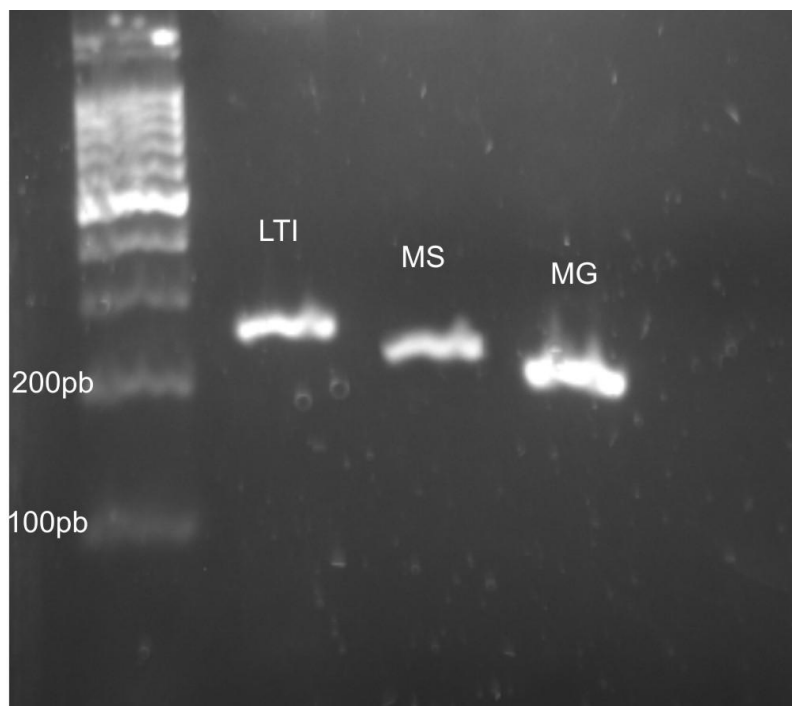
Na PCR dos gânglios novamente foram obtidos resultados negativos para todas as amostras analisadas.



**Figura 11:** Quantitativo de galinhas positivas pela PCR para o GaHV-1 no ano de 2013.

Das aves enviadas pelos veterinários do IMA, seis que adoeceram em agosto de 2012 e três que adoeceram em setembro de 2013 foram submetidas à PCR, onde 5/6 (84%) e 2/3 (67%) foram positivas para GaHV-1 respectivamente. Das quatro aves estudadas de 2011, uma delas foi positiva para o GaHV-1.

O controle positivo resultou na amplificação de produtos com o tamanho molecular esperado, enquanto que não foram observadas amplificações nos controles negativos correspondentes.



**Figura 12:** Imagem de uma corrida de eletroforese para os diferentes agentes etiológicos: GaHV-1 (LTI) com produto de PCR de aproximadamente 237 pares de base; MS (*Mycoplasma synoviae*) com produto de 207 pares de base; e MG (*Mycoplasma gallisepticum*) com um produto de 185 pares de base. Gel de agarose (3%).

### 5.6.2 Diagnóstico diferencial

Também foram testados os materiais genéticos extraídos das traqueias para outros patógenos respiratórios, incluídos na lista de diagnóstico diferencial da LTI, como o *Mycoplasma gallisepticum* e o *Mycoplasma synoviae*. Na análise das 117 aves coletadas em 2012, 65 (56%), amplificaram um produto de 185 pares de base (Figura 12), sendo consideradas positivas para *Mycoplasma gallisepticum*. Enquanto que em 2013, 12 (29%) de 42 aves tiveram esse mesmo produto de amplificação, e também foram consideradas positivas.

Para a PCR do *Mycoplasma synoviae*, nas amostras analisadas em 2012, 72 (62%) aves de 117 foram consideradas positivas, onde se obteve um produto de 207 pares de base (Figura 12), enquanto que em 2013, apenas oito aves (19%) de 42 foram positivas.

Na análise das coinfeções observadas em 2012 para os diferentes agentes testados, várias aves, 50/117 (43%), foram positivas para o GaHV-1, *M. gallisepticum* e *M. synoviae* concomitantemente. Enquanto que 81/117 (69%) foram positivas para pelo menos um patógeno, e apenas 36/117 (31%) foram negativas para os três agentes testados. Na tabela 7 encontram-se detalhados as co-infecções observadas no respectivo período.

**Tabela 7:** Número de aves positivas para o GaHV-1, *M. gallisepticum* e *M. synoviae* das 117 aves avaliadas em 2012.

Patógenos testados (2012)	Número de aves positivas
GaHV-1	02
MG	02
MS	05
GaHV-1/MG/MS	50
GaHV-1/MG	5
GaHV-1/MS	9
MG/MS	8

Diferentemente do que foi observado durante o ano de 2012, em 2013 foi observado um menor número de aves positivas, onde das 42 aves estudadas, apenas 4/42 foram positivas para o GaHV-1, *M. gallisepticum* e *M. synoviae* concomitantemente, e 16/42 (38%) foram

positivas para pelo menos um patógeno. Neste período, diferentemente de 2012, a maior parte das aves foram negativas para os três agentes testados 26/42 (62%). Na tabela 8 encontram-se detalhados as co-infecções observadas no respectivo período.

**Tabela 8:** Número de aves positivas para o GaHV-1, *M. gallisepticum* e *M. synoviae* das 42 aves avaliadas em 2013.

Patógenos testados (2013)	Número de aves positivas
GaHV-1	01
MG	06
MS	03
GaHV-1/MG/MS	04
GaHV-1/MG	01
GaHV-1/MS	00
MG/MS	01

Das quatro aves coletadas em 2011, três foram positivas para *Mycoplasma gallisepticum*, sendo que a positiva para o GaHV-1 foi negativa para o *M. gallisepticum*.

### 5.6.3 Codornas

Outros possíveis hospedeiros para o GaHV-1 foram testados quanto à possibilidade de infecção. Foram realizados PCR para o GaHV-1 nas 18 codornas coletadas em setembro de 2013, tanto de DNA extraído de traqueia, como de gânglio do nervo trigêmeo. Todos os tecidos analisados foram negativos para o agente pesquisado.

## 5.7 Sequenciamento

### 5.7.1 Laringotraqueíte

#### 5.7.1.1 Gene ICP4

Para o sequenciamento de fragmentos do gene ICP4, cinco amostras positivas pela PCR, duas de 2012 (2012/UFMG1 e 2012/UFMG2) e duas de 2013 (2013/UFMG1 e 2013/UFMG2) foram selecionadas para análise das sequências obtidas. A amostra coletada em 2011 (2011/UFMG1) também foi utilizada. Foram amplificados dois fragmentos, um de 688 pares de base e um segundo de 635 pares de base, localizados na posição 205 a 811 e 3824 a 4411 do gene ICP4, respectivamente. As sequências do gene

ICP4 obtidas a partir do DNA extraído dos isolados 2011/UFMG1, 2012/UFMG1, 2012/UFMG2, 2013/UFMG1, 2013/UFMG2 foram idênticos entre si (100% de similaridade), mas apresentaram mutações quando comparadas a outros isolados do Brasil e em outros países. Em duas posições do gene ICP4 houve alteração de nucleotídeo que foi observada apenas nos isolados obtidos conforme tabela 9 e 10, de uma guanina para timina na posição 539 do gene, e de citocina para timina na posição 626 do gene. Estas alterações não foram observadas em nenhuma amostra brasileira previamente caracterizada, e tampouco nos isolados de outros países sul-americanos.

Estas mutações pontuais de substituição de nucleotídeos acarretaram alteração na sequência de aminoácidos (mutação não sinônimas) do gene ICP4, de uma arginina (R) (básico, polar hidrofílico positivo) para metionina (M) (hidrofóbico) na posição 180 da sequência de aminoácidos, e de uma alanina (apolar, fracamente hidrofóbico, pouco reativo em reações tridimensionais) para valina (hidrofóbico) na posição 209 da sequência de aminoácidos. Além disso, os isolados analisados agruparam-se em um ramo diferente de outras amostras brasileiras e de outros países, com um suporte de *bootstrap* maior que 60, conforme observado na figura 13. Deleções e inserções nas sequências não foram detectadas.



**Tabela 9:** Comparações das sequências de nucleotídeos do gene ICP4 fragmento 1 de amostras de Minas Gerais, estirpes vacinais e outras estirpes do GaHV-1 publicadas no *genbank*. As posições 539 e 626 apresentam as mutações exclusivas observadas nas sequências obtidas, onde houve a substituição de uma guanina por uma timina e de uma citosina por uma timina, respectivamente.

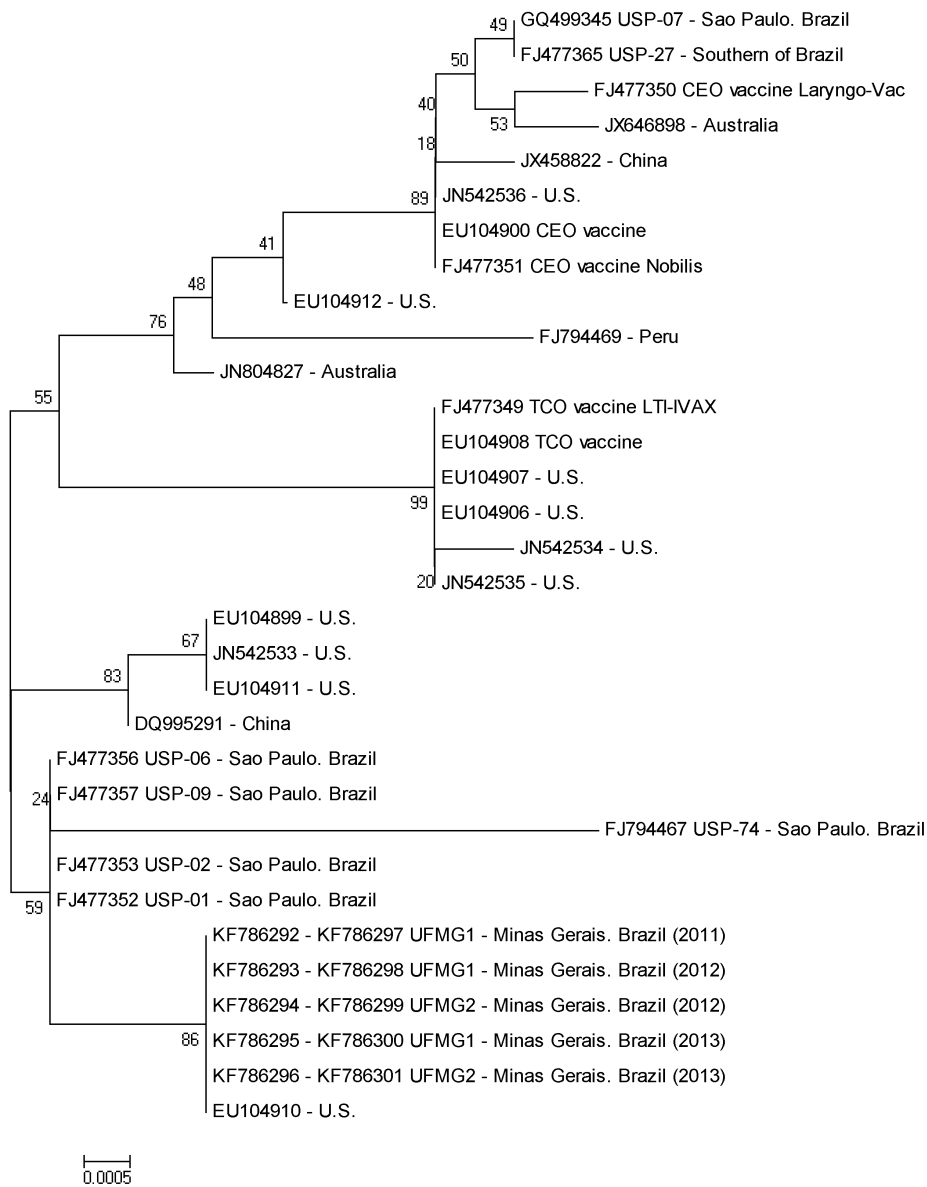
Posição no gene	284	430	438	456	539	598	626	688	799
2011 UFMG1	T	G	G	G	T	G	T	A	G
2012 UFMG1	.	.	.	.	.	.	.	.	.
2012 UFMG2	.	.	.	.	.	.	.	.	.
2013 UFMG1	.	.	.	.	.	.	.	.	.
2013 UFMG2	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Brazil FJ477352 USP-01	.	.	.	.	G	.	C	.	.
Brazil FJ477353 USP-02	.	.	.	.	G	.	C	.	.
Brazil FJ477356 USP-06	.	.	.	.	G	.	C	.	.
Brazil FJ477357 USP-09	.	.	.	.	G	.	C	.	.
Brazil FJ794467 USP-74	.	A	.	.	G	.	C	.	.
Brazil GQ499345 USP-07	.	.	A	A	G	A	C	G	.
Brazil FJ477365 USP-27	.	.	A	A	G	A	C	G	.
FJ477351 CEO vaccine Nobilis	.	.	A	A	G	A	C	.	.
FJ477350 CEO vaccine Laryngo-Vac	.	.	A	A	G	A	C	G	.
FJ477349 TCO vaccine LTI-IVAX	.	.	.	A	G	.	C	.	.
EU104900 CEO vaccine	.	.	A	A	G	A	C	.	.
EU104908 TCO vaccine	.	.	.	A	G	.	C	.	.
Peru FJ794469	.	.	.	A	G	A	C	.	.
China DQ995291	.	.	.	.	G	.	C	.	.
China JX458822	.	.	A	A	G	A	C	.	.
Australia JN804827	.	.	A	A	G	A	C	.	.
Australia JX646898	C	.	A	A	G	A	C	.	.
USA EU104911	.	.	.	.	G	.	C	.	A
USA EU104899	.	.	.	.	G	.	C	.	A
USA EU104910	.	.	.	.	.	.	.	.	.
USA EU104907	.	.	.	A	G	.	C	.	.
USA EU104906	.	.	.	A	G	.	C	.	.
USA EU104912	.	.	A	A	G	A	C	.	.

<b>Posição no gene</b>	<b>284</b>	<b>430</b>	<b>438</b>	<b>456</b>	<b>539</b>	<b>598</b>	<b>626</b>	<b>688</b>	<b>799</b>
USA JN542536	.	.	A	A	G	A	C	.	.
USA JN542534	.	.	.	A	G	.	C	.	.
USA JN542533	.	.	.	.	G	.	C	.	A
USA JN542535	.	.	.	A	G	.	C	.	.

**Tabela 10:** Comparações das sequências de nucleotídeos do gene ICP4 fragmento 2 de amostras de Minas Gerais, estirpes vacinais e outras estirpes do GaHV-1 publicadas no *genbank*.

Posição no gene	3834	3836	3837	3905	3957	3981	3992	4012	4013	4016	4047	4101	4111	4223	4298	4311	4339	4377	4387	4388	4391	
2011 UFMG1	G	A	C	C	C	C	G	A	G	A	G	T	G	A	C	A	T	C	G	A	C	
2012 UFMG1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
2012 UFMG2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
2013 UFMG1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
2013 UFMG2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Brazil FJ477352 USP-01	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Brazil FJ477353 USP-02	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Brazil FJ477356 USP-06	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Brazil FJ477357 USP-09	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Brazil FJ794467 USP-74	C	C	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	T	A	.
Brazil GQ499345 USP-07	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.
Brazil FJ477365 USP-27	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.
FJ477351 CEO vaccine Nobilis	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.
FJ477350 CEO vaccine Laryngo	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	G	.	A	.	.	.	.
FJ477349 TCO vaccine LTIVAX	.	.	.	.	T	T	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	A	A	.	.	.	.
EU104900 CEO vaccine	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.
EU104908 TCO vaccine	.	.	.	.	T	T	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	A	A	.	.	.	.

Posição no gene	3834	3836	3837	3905	3957	3981	3992	4012	4013	4016	4047	4101	4111	4223	4298	4311	4339	4377	4387	4388	4391
Peru EJ794469	.	.	.	T	.	.	A	.	A	.	.	A	A	.	.	.	.	.	.	.	.
China DQ995291	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.
China JX458822	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	A	.	.	G	.	.	.	A	.	.	.
Australia JN804827	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Australia JX646898	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	G	.	A	.	.	.
USA EU104911	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.
USA EU104899	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.
USA EU104910	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
USA EU104907	.	.	.	.	T	T	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	A	A	.	.	.
USA EU104906	.	.	.	.	T	T	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	A	A	.	.	.
USA EU104912	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
USA JN542536	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.
USA JN542534	.	.	.	.	T	T	.	G	.	G	.	.	.	.	.	.	A	A	.	.	.
USA JN542533	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.
USA JN542535	.	.	.	.	T	T	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	A	A	.	.	.



**Figure 13:** Árvore filogenética gerada a partir da sequência concatenada de nucleotídeos dos fragmentos do gene ICP4 1 (688pb) e 2 (635pb) das estirpes de GaHV-1 e vacinais. Método: *Neighbor-joining* com análise *bootstrap* de 1000 repetições usando o modelo Kimura 2-parâmetros.

As sequências obtidas neste estudo foram depositadas na data base do *genbank* com os seguintes números de acesso: ICP4 fragmento 1: 2011/UFMG1 (KF786292); 2012/UFMG1 (KF786293); 2012/UFMG2 (KF786294); 2013/UFMG1 (KF786295); 2013/UFMG2 (KF786296). ICP4 fragmento 2: 2011/UFMG1 (KF786297); 2012/UFMG1 (KF786298); 2012/UFMG2 (KF786299); 2013/UFMG1 (KF786300); 2013/UFMG2 (KF786301).

### 5.7.1.2 Gene TK

As amostras 2011/UFMG1, 2012/UFMG1, 2012/UFMG2, 2013/UFMG1, 2013/UFMG2 também foram utilizadas na análise do gene TK, onde foi amplificado um fragmento de 783 pares de base. Mais uma vez, as sequências parciais das amostras 2011/UFMG1, 2012/UFMG1, 2012/UFMG2, 2013/UFMG1,

2013/UFMG2 foram idênticas entre elas (100% de similaridade), mas apresentaram divergências com as sequências de outros isolados do Brasil e de outros países. Na análise de nucleotídeos, houve uma mutação não sinônima exclusiva das amostras sequenciadas neste estudo, com a substituição de uma adenina para uma citosina na posição 568 do gene, conforme a tabela 11. Estas mudanças acarretaram uma mudança de uma metionina para uma leucina, ambos hidrofóbicos, na posição 190.

A análise do gene TK também foi realizada buscando identificar uma mutação específica na posição 252 da sequência de aminoácidos, que de acordo com a literatura estaria relacionada a estirpes mais virulentas. Em todas as sequências obtidas foi observada uma treonina nessa posição (Tabela 12).

**Tabela 11:** Comparações das sequências de nucleotídeos do gene TK de amostras de Minas Gerais, estirpes vacinais e outras estirpes do GaHV-1 publicadas no *genbank*. A posição 568, apresenta a mutação exclusiva observada nas sequências obtidas, onde houve a substituição de adenina por uma citosina.

Posição no gene	289	304	441	540	568	594	634	650	755	797	800
2011 UFMG1	C	C	G	C	C	A	G	G	C	T	C
2012 UFMG1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
2012 UFMG2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
2013 UFMG1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
2013 UFMG2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Brazil FJ444833 USP-01	.	.	.	.	A	C	.	.	T	.	.
Brazil FJ444834 USP-02	.	.	.	.	A	C	.	.	T	.	.
Brazil GQ499341 USP-07	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.
Brazil FJ444836 USP-09	.	.	.	.	A	C	.	.	T	.	.
Brazil DQ786400 USP-22	.	.	.	.	A	C	.	.	T	.	.
Brazil DQ786401 USP-27	.	.	.	.	A	C	.	.	T	.	G
Brazil FJ444847 USP-57	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.
Brazil FJ444832 LTI-IVAX	.	.	.	.	A	.	.	.	.	G	.
Italy HM230801 CEO vaccine	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.
Italy HM230794	.	.	.	T	A	.	.	.	.	.	.
USA S83714	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.
United Kingdom D00565	.	T	.	.	A	.	.	.	.	.	.
Taiwan EU423897 SP-Trachivax	.	.	.	.	A	.	.	A	.	.	.
Switzerland EU360950 TCO (2)	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.
Switzerland EU360950 TCO	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.
Switzerland EU360946	.	.	.	T	A	.	.	.	.	.	.
China AF435453	.	T	.	.	A	.	.	.	.	.	.
China DQ522949	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.
China DQ522947	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.
Australia JX646898	.	.	A	.	A	.	.	.	.	.	.

<b>Posição no gene</b>	<b>289</b>	<b>304</b>	<b>441</b>	<b>540</b>	<b>568</b>	<b>594</b>	<b>634</b>	<b>650</b>	<b>755</b>	<b>797</b>	<b>800</b>
Australia JN804827	.	.	.	.	A	C	.	.	T	.	.
China JX458822	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.
USA JN542536	T	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.
USA JN542534	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.
USA JN542533	.	.	.	.	A	.	A	.	.	.	.
USA JN542535	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.
USA NC 006623	.	T	.	.	A	.	.	.	.	.	.

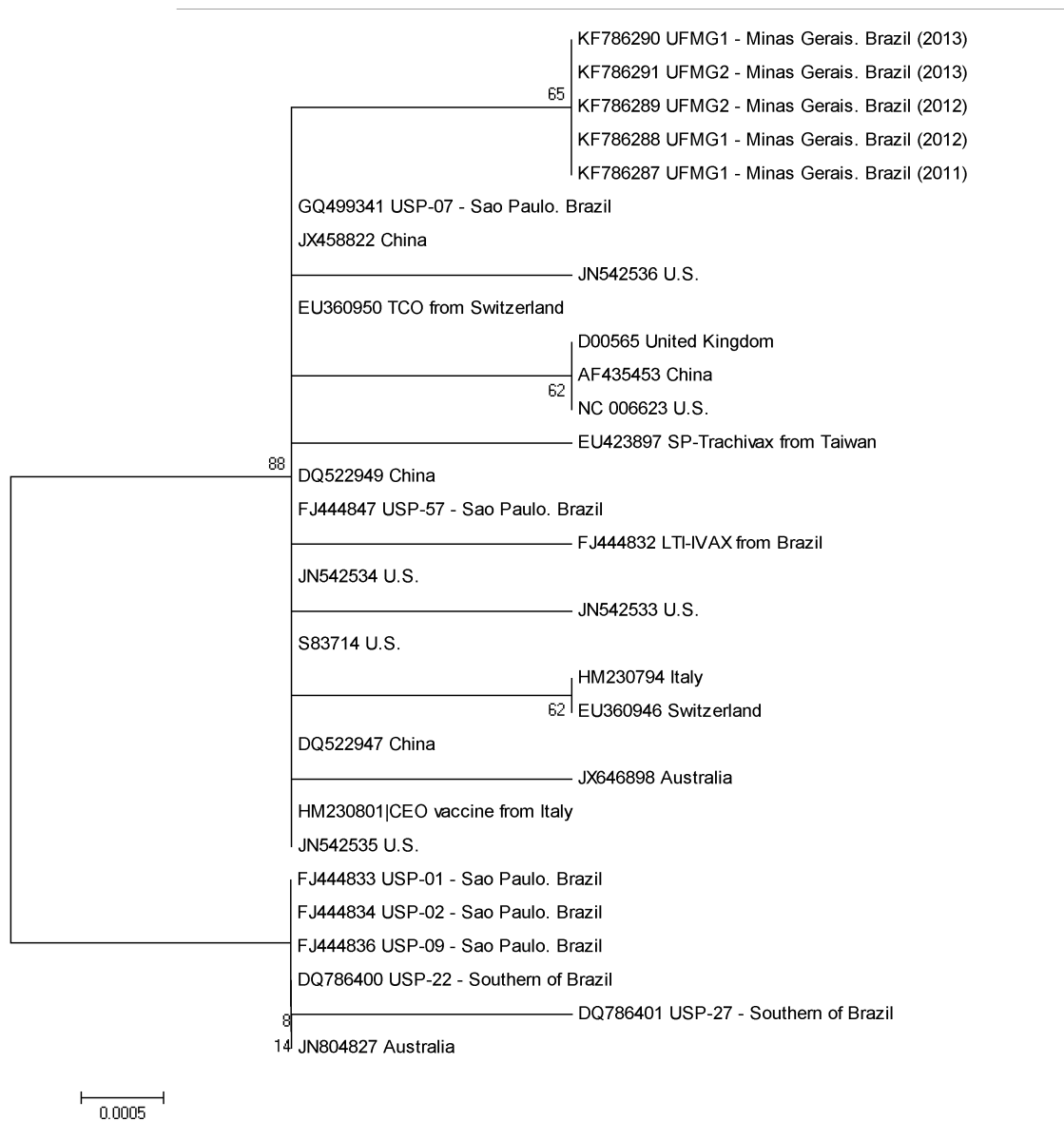


**Tabela 12:** Comparações entre as sequências de aminoácidos do gene TK de amostras de Minas Gerais, estirpes vacinais e outras estirpes do GaHV-1, a partir da tradução de sequências depositadas no *Genbank*. As sequências obtidas apresentaram uma treonina na posição 252.

Posição na sequência de aminoácido	97	102	190	212	217	252	266	267
2011 UFMG1	R	R	L	D	C	T	V	P
2012 UFMG2	.	.	.	.	.	.	.	.
2012 UFMG3	.	.	.	.	.	.	.	.
2013 UFMG4	.	.	.	.	.	.	.	.
2013 UFMG5	.	.	.	.	.	.	.	.
Brazil FJ444833 USP-01	.	.	M	.	.	M	.	.
Brazil FJ444834 USP-02	.	.	M	.	.	M	.	.
Brazil GQ499341 USP-07	.	.	M	.	.	.	.	.
Brazil FJ444836 USP-09	.	.	M	.	.	M	.	.
Brazil DQ786400 USP-22	.	.	M	.	.	M	.	.
Brazil DQ786401 USP-27	.	.	M	.	.	M	.	R
Brazil FJ444847 USP-57	.	.	M	.	.	.	.	.
Brazil FJ444832 LTI-IVAX	.	.	M	.	.	.	G	.
Italy HM230801 CEO vaccine	.	.	M	.	.	.	.	.
Italy HM230794	.	.	M	.	.	.	.	.
USA S83714	.	.	M	.	.	.	.	.
United Kingdom D00565	.	C	M	.	.	.	.	.
Taiwan EU423897 SP-Trachivax	.	.	M	.	Y	.	.	.
Switzerland EU360950 TCO	.	.	M	.	.	.	.	.
Switzerland EU360946	.	.	M	.	.	.	.	.
China AF435453	.	C	M	.	.	.	.	.
China DQ522949	.	.	M	.	.	.	.	.
China DQ522947	.	.	M	.	.	.	.	.
Australia JX646898	.	.	M	.	.	.	.	.
Australia JN804827	.	.	M	.	.	M	.	.
China JX458822	.	.	M	.	.	.	.	.
USA JN542536	W	.	M	.	.	.	.	.
USA JN542534	.	.	M	.	.	.	.	.
USA JN542533	.	.	M	N	.	.	.	.
USA JN542535	.	.	M	.	.	.	.	.
USA NC 006623	.	C	M	.	.	.	.	.

As amostras analisadas, assim como para o fragmento do gene TK, formaram um grupamento diferente de outras amostras

brasileiras e de outros países, com um suporte de *bootstrap* maior que 60, conforme observado na figura 14.



**Figure 14:** Árvore filogenética gerada a partir da sequência de nucleotídeos dos fragmentos do gene TK das estirpes de GaHV-1 e vacinais. Método: *Neighbor-joining* com análise *bootstrap* de 1000 repetições usando o modelo Kimura 2-parâmetros.

As sequências obtidas neste estudo foram depositadas na base de dados *GenBank* com os seguintes números de acesso: KF786287 (2011/UFMG1); KF786288 (2012/UFMG1); KF786289 (2012/UFMG2); KF786290 (2013/UFMG1); KF786291 (2013/UFMG2).

## 5.7.2 Diagnóstico diferencial (*Mycoplasma gallisepticum*)

### 5.7.2.1 IGSR

Para o sequenciamento da região intergênica (IGSR), um total de sete amostras positivas pela PCR para o *Mycoplasma gallisepticum* foram utilizadas, três de 2011 coletadas em estudos anteriores, (2011/1, 2011/2 e 2011/3), uma de 2012 (2012/1), duas de 2013 (2013/1 e 2013/2) e uma amostra vacinal (MG-70 BIOVET®). Foi amplificado um fragmento de 812 pares de base localizado entre a posição 321.490 e 322.280 do genoma do *Mycoplasma gallisepticum* entre os genes 16S e 23S rRNA.

As sequências obtidas apresentaram considerável variação nucleotídica entre elas, onde puderam ser observadas mutações, inserções e deleções (Tabela 13). A amostra 2011/3 apresentou maior variância, sendo observadas duas mutações exclusivas da estirpe, não sendo observada em nenhuma outra amostra sequenciada no presente trabalho ou já submetida no *GenBank*. Na posição 364 houve a substituição de uma guanina por uma adenina, e na posição 459 de uma guanina por uma timina. Estas mutações pontuais de substituição de nucleotídeos acarretaram alteração na sequência de aminoácidos, de uma Alanina (A) para uma treonina (T) na posição 122 e de uma Guanina (G) para Valina (V) na posição 153 respectivamente.

As amostras 2011/1 e 2011/2 foram idênticas entre elas, e apresentaram 100% de similaridade com uma amostra americana (KC247850). Já a vacina MG-70 apresentou 100% de identidade com as estirpes indiana (KC247859) e espanhola (KC247858). Por fim, a amostra 2012/1 não pode ser diferenciada (com identidade de 100%) das amostras da Venezuela (KC247847) e da amostra vacinal americana F (KC143383).

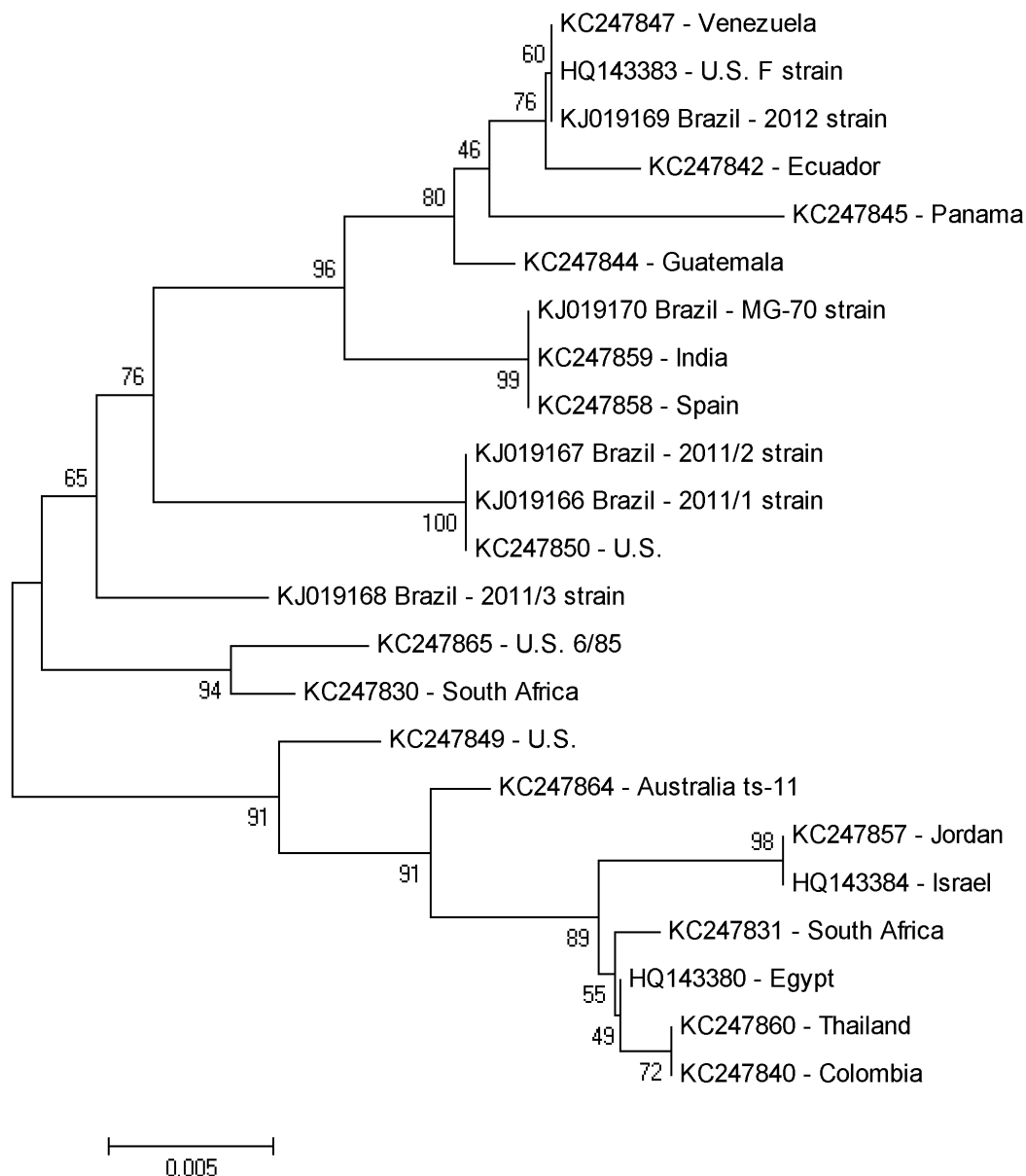
A árvore filogenética agrupou as amostras estudadas em diferentes grupos, todos com *bootstrap* maior que 60, conforme representado na Figura 15. As amostras 2013/1 e 2013/2 não apresentaram amplificação da região intergênica.

**Tabela 13:** Comparações das sequências de nucleotídeos da região intergênica (IGSR) de amostras de Minas Gerais, estirpes vacinais e outras estirpes do *Mycoplasma gallisepticum* publicadas no *GenBank*. Posições 112 a 364. A estirpe 2011/3 apresentou maior variância entre as sequências obtidas, com duas mutações exclusivas dessa estirpe nas posições 364 e 459 da região intergênica.

Posição no gene	112	142	148	162	195	197	225	227	230	233	238	239	251	257	263	275	281	282	283	286	311	317	337	342	351	352	357	363	364
Brazil - 2011/3 strain	T	C	G	C	G	-	G	A	C	C	A	G	A	A	C	C	T	G	A	A	-	T	C	A	T	A	T	C	A
Brazil - 2011/2 strain	.	.	.	.	.	-	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	-	.	.	C	.	G
Brazil - 2011/1 strain	.	.	.	.	.	-	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	-	.	.	C	.	G
Brazil - 2012 strain	A	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	G
Brazil - MG-70 strain	.	.	.	T	.	-	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	A	C	.	.	C	.	.	.	G
KC247865 - U.S. 6/85	.	.	.	T	.	A	.	T	G	.	.	T	.	C	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	T	G
KC247864 - Australia ts-11	.	.	.	T	.	A	.	T	G	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	G	.	.	G
KC247860 - Thailand	.	.	.	T	.	A	.	T	G	.	.	T	.	.	G	T	.	C	G	T	A	.	.	.	-	G	.	.	G
KC247859 - India	.	.	.	T	.	-	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	A	C	.	.	C	.	.	.	G
KC247858 - Spain	.	.	.	T	.	-	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	A	C	.	.	C	.	.	.	G
KC247857 - Jordan	.	.	A	T	.	A	A	T	G	.	.	T	.	.	G	T	C	C	.	T	A	.	.	.	-	G	.	.	G
KC247850 - U.S.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	-	.	.	C	.	G
KC247849 - U.S.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	G	.	.	G
KC247847 - Venezuela	A	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	G
KC247845 - Panama	A	.	.	.	.	-	.	.	.	.	T	.	.	.	.	T	.	.	.	.	A	.	T	.	.	.	.	.	G
KC247844 - Guatemala	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	T	G	-	.	.	.	G
KC247842 - Ecuador	A	A	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	G	.	.	T	.	.	.	.	A	.	.	.	-	.	.	.	G
KC247840 - Colombia	.	.	.	T	.	A	.	T	G	.	.	T	.	.	G	T	.	C	G	T	A	.	.	.	-	G	.	.	G
KC247831 - South Africa	.	.	.	T	.	A	.	T	G	.	.	T	.	.	G	T	.	C	.	T	-	.	.	.	.	G	.	.	G
KC247830 - South Africa	.	.	.	.	T	A	.	T	G	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	T	G
HQ143384 - Israel	.	.	A	T	.	A	A	T	G	.	.	T	.	.	G	T	C	C	.	T	A	.	.	.	-	G	.	.	G
HQ143383 - U.S. F strain	A	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	G
HQ143380 - Egypt	.	.	.	T	.	A	.	T	G	.	.	T	.	.	G	T	.	C	.	T	A	.	.	.	-	G	.	.	G

Continuação tabela 12, posições 380 a 635.

Posição no gene	380	386	388	393	397	402	407	409	410	424	428	432	459	466	467	468	481	482	488	511	517	529	532	544	635
Brazil - 2011/3 strain	T	T	C	C	G	A	G	C	T	T	C	G	T	T	G	C	C	T	T	T	A	G	G	T	A
Brazil - 2011/2 strain	.	.	.	T	.	.	A	G	C	.	T	.	G	.	.	.	.	C	.	.	G	.	.	.	.
Brazil - 2011/1 strain	.	.	.	T	.	.	A	G	C	.	T	.	G	.	.	.	.	C	.	.	G	.	.	.	.
Brazil - 2012 strain	.	G	T	T	.	.	.	.	.	C	.	.	G	.	.	.	.	C	C	.	G	.	A	A	.
Brazil - MG-70 strain	.	G	T	T	.	.	.	.	.	C	.	.	G	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	A	.
KC247865 - U.S. 6/85	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	C	.	.	G	A	.	.	.
KC247864 - Australia ts-11	C	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	C	G	A	T	.	T	.	.	.	G	.	.	.	.
KC247860 - Thailand	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	C	G	A	T	.	T	.	.	.	G	.	.	.	.
KC247859 - India	.	G	T	T	.	.	.	.	.	C	.	.	G	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	A	.
KC247858 - Spain	.	G	T	T	.	.	.	.	.	C	.	.	G	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	A	.
KC247857 - Jordan	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	A	G	A	T	.	T	.	.	.	G	.	.	.	.
KC247850 - U.S.	.	.	.	T	.	.	A	G	C	.	T	.	G	.	.	.	.	C	.	.	G	.	.	.	.
KC247849 - U.S.	C	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	C	G	A	T	.	T	.	.	.	G	.	.	.	.
KC247847 - Venezuela	.	G	T	T	.	.	.	.	.	C	.	.	G	.	.	.	.	C	C	.	G	.	A	A	.
KC247845 - Panama	.	.	T	T	.	.	.	.	.	C	.	.	G	.	.	T	.	C	C	G	G	.	.	A	G
KC247844 - Guatemala	.	G	T	T	.	.	.	.	.	C	.	.	G	.	.	.	.	C	C	.	G	.	A	A	.
KC247842 - Ecuador	.	G	T	T	.	.	.	.	.	C	.	.	G	.	.	.	.	C	C	.	G	.	A	A	.
KC247840 - Colombia	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	C	G	A	T	.	T	.	.	.	G	.	.	.	.
KC247831 - South Africa	C	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	C	G	A	T	.	T	.	.	.	G	.	.	.	.
KC247830 - South Africa	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	C	.	.	G	A	.	.	.
HQ143384 - Israel	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	A	G	A	T	.	T	.	.	.	G	.	.	.	.
HQ143383 - U.S. F strain	.	G	T	T	.	.	.	.	.	C	.	.	G	.	.	.	.	C	C	.	G	.	A	A	.
HQ143380 - Egypt	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	C	G	A	T	.	T	.	.	.	G	.	.	.	.



**Figure 15:** Árvore filogenética gerada a partir da sequência de nucleotídeos da região intergênica (IGSR) das estirpes de *Mycoplasma gallisepticum* e vacinais. A estirpe 2012 foi agrupada juntamente à estirpe vacinal F americana. Método: *Neighbor-joining* com análise *bootstrap* de 1000 repetições usando o modelo Kimura 2-parâmetros.

As sequências obtidas neste estudo foram depositadas na data base do *GenBank* com os seguintes números de acesso: KJ019166 (2011/1), KJ019167 (2011/2), KJ019168 (2011/3), KJ019169 (2012/1) e KJ019170 (MG-70).

### 5.7.2.2 Gene *mgc2*

As mesmas amostras utilizadas na amplificação dos produtos para a região intergênica (IGSR) também foram utilizadas para o gene *mgc2*. Diferentemente do ocorrido para a região

intergênica (IGSR), as amostras 2013/1 e 2013/2 apresentaram amplificação, e mais uma vez, obteve-se variação nucleotídica entre as estirpes obtidas no estudo (Tabela 14), porém, ao contrário do resultado anterior, nenhuma mutação exclusiva para as amostras obtidas foi encontrada no gene *mgc2*.

Na análise nucleotídica deste gene, formaram-se dois principais grupos de amostras. As amostras 2013/1, 2013/2, 2011/1 e MG-70 não apresentaram diferenças entre elas, e foram idênticas às estirpes norte americana (KC247882) e espanhola (KC247891). Enquanto que, as amostras 2011/2 e 2011/3 apresentaram

100% de identidade entre elas e com a amostra sul africana (KC247868), diferindo das estirpes da Guatemala (KC24877), Venezuela (KC247880), África do Sul (KC247866) e da vacina australiana ts-11 (KC247898) por apenas um nucleotídeo na posição 593 do gene, onde as sequências 2011/2 e 2011/3 apresentaram uma timina ao invés de uma citosina. A amostra 2012/1 apresentou 100% de similaridade com a estirpe vacinal americana F.

A árvore filogenética agrupou as amostras estudadas em diferentes grupos, todos com *bootstrap* maior que 60, conforme representado na (Figura 16).

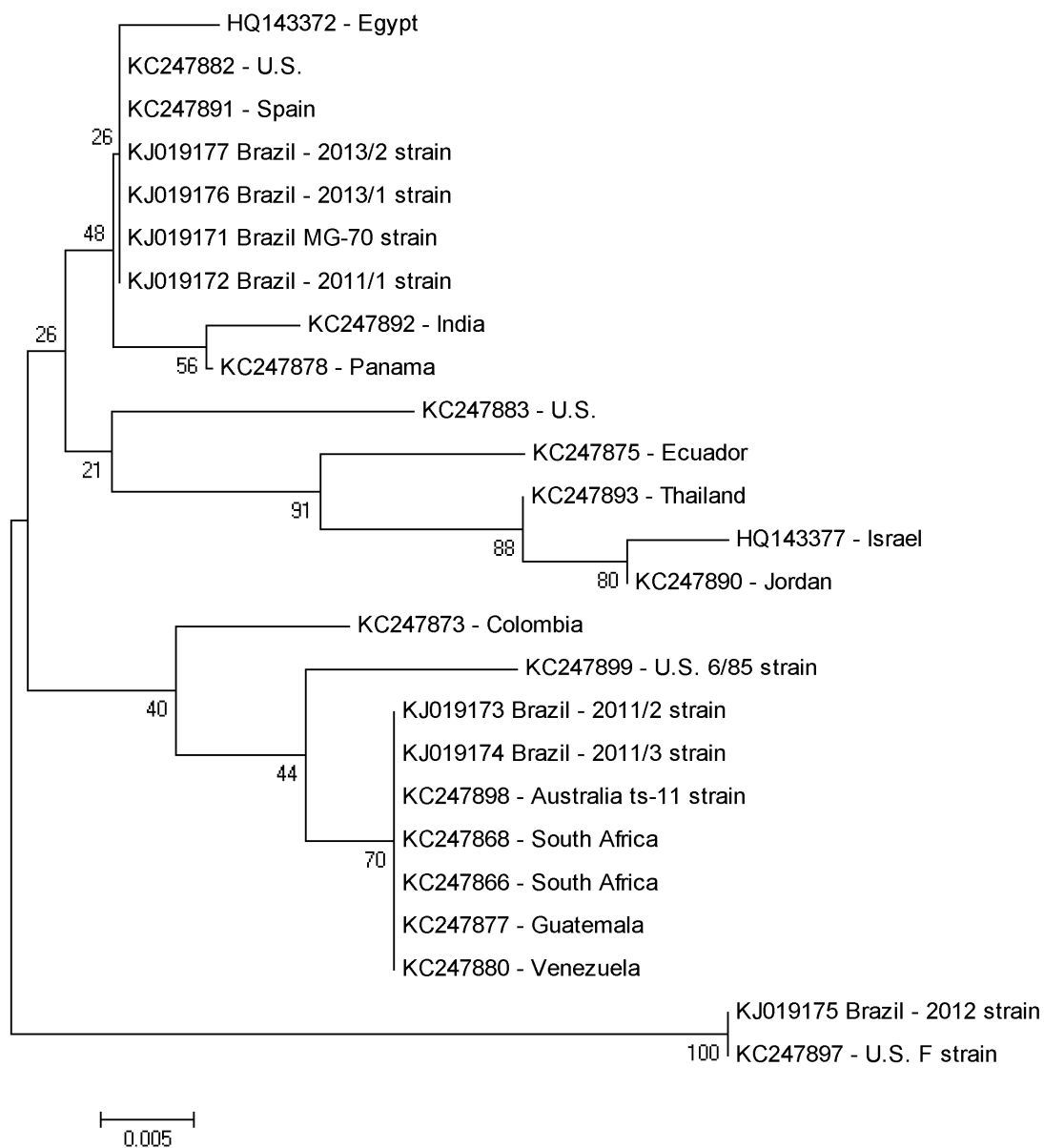
**Tabela 14:** Comparações das sequências de nucleotídeos do fragmento do gene *mgc2* de amostras de Minas Gerais, estirpes vacinais e outras estirpes do *Mycoplasma gallisepticum* publicadas no *genbank*.

Posição no gene	494	498	501	504	507	508	510	519	525	526	527	530	531	537	543	549	561	570	571	582	585	588	593	600	606	611	612	624	631
Brazil - 2011/1 strain	G	T	C	A	G	G	C	C	G	C	C	C	T	A	A	A	C	C	C	A	A	G	C	A	A	G	A	C	C
Brazil - 2011/2 strain	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	T	.	G	.	.	.	.	.
Brazil - 2011/3 strain	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	T	.	G	.	.	.	.	.
Brazil - 2012 strain	.	.	T	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	C	G	G	.	G	.	T	G	.	.	C	G	.	G	.	.
Brazil MG-70 strain	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Brazil - 2013/1 strain	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Brazil - 2013/2 strain	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
KC247899 - U.S. 6/85 strain	.	.	.	G	.	.	.	.	.	T	.	T	.	.	G	.	.	.	.	.	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KC247897 - U.S. F strain	.	.	T	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	C	G	G	.	G	.	T	G	.	.	C	G	.	G	.	.
KC247898 - Australia ts-11 strain	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.
KC247868 - South Africa	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	T	.	G	.	.	.	.
KC247866 - South Africa	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.
KC247873 - Colombia	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.
HQ143372 - Egypt	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
KC247875 - Ecuador	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	T	.
KC247891 - Spain	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
KC247877 - Guatemala	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.
KC247892 - India	.	G	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HQ143377 - Israel	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	A	T
KC247890 - Jordan	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	A	T
KC247878 - Panama	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
KC247893 - Thailand	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
KC247883 - U.S.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	A	.	-	-	-	-	-	.	C	.	.	.
KC247882 - U.S.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
KC247880 - Venezuela	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.



Continuação tabela 14, posições 633 a 739.

Posição no gene	633	636	648	654	674	696	702	725	737	738	739
Brazil - 2011/1 strain	C	A	A	G	C	T	A	C	T	G	C
Brazil - 2011/2 strain	.	.	.	.	.	C	.	.	C	.	.
Brazil - 2011/3 strain	.	.	.	.	.	C	.	.	C	.	.
Brazil - 2012 strain	A	T	T	.	.	.	.	.	.	C	T
Brazil MG-70 strain	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Brazil - 2013/1 strain	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Brazil - 2013/2 strain	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
KC247899 - U.S. 6/85 strain	-	-	-	.	.	C	.	.	C	.	.
KC247897 - U.S. F strain	A	T	T	.	.	.	.	.	.	C	T
KC247898 - Australia ts-11 strain	.	.	.	.	.	C	.	.	C	.	.
KC247868 - South Africa	.	.	.	.	.	C	.	.	C	.	.
KC247866 - South Africa	.	.	.	.	.	C	.	.	C	.	.
KC247873 - Colombia	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.
HQ143372 - Egypt	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
KC247875 - Ecuador	.	.	.	A	.	C	.	.	C	.	.
KC247891 - Spain	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
KC247877 - Guatemala	.	.	.	.	.	C	.	.	C	.	.
KC247892 - India	-	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.
HQ143377 - Israel	.	.	.	A	T	C	.	.	C	A	.
KC247890 - Jordan	.	.	.	A	T	C	.	.	C	A	.
KC247878 - Panama	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
KC247893 - Thailand	.	.	.	A	T	C	.	.	C	A	.
KC247883 - U.S.	A	.	-	.	.	C	.	.	.	.	.
KC247882 - U.S.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
KC247880 - Venezuela	.	.	.	.	.	C	.	.	C	.	.



**Figura 16:** Árvore filogenética gerada a partir da sequência de nucleotídeos do gene *mgc2* das estirpes de *Mycoplasma gallisepticum* e vacinais. A estirpe 2012 foi agrupada juntamente à estirpe vacinal F americana. Método: *Neighbor-joining* com análise *bootstrap* de 1000 repetições usando o modelo Kimura 2-parâmetros.

As sequências obtidas neste estudo foram depositadas na data base do *GenBank* com os seguintes números de acesso: KJ019171 (MG-70), KJ019172 (2011/1), KJ019173

(2011/2), KJ019174 (2011/3), KJ019175 (2012/1), KJ019176 (2013/1) e KJ019177 (2013/2).

### 5.8 Análise das aves vacinadas e não vacinadas com as vacinas vectoradas para LTI

Neste estudo foram selecionadas granjas em que era feito o programa para vacinação de laringotraqueíte e também duas granjas em que não era feita a vacinação, ainda no ano de 2012. Nas granjas com o programa de vacinação, as coletas foram realizadas em lotes/galpões de aves vacinadas (mais jovens) para LTI e lotes de aves não vacinadas (mais velhas) no pico de produção e final de produção.

Foi realizada uma análise de amostras de aves vacinadas (108 – 68%) e não vacinadas (51 – 32%) quanto a positividade para o GaHV-1 à PCR sendo positivas (71 – 45%) e negativas (88 – 55%). Do total de aves analisadas (159), 40 (37%) eram vacinadas e positivas, 31 (60%) eram não vacinadas e também positivas para o GaHV-1. Enquanto que, 68 (63%) eram vacinadas e negativas e 20 (40%) não vacinadas e negativas para o GaHV-1. Os resultados aqui descritos encontram-se na tabela 15.

**Tabela 15:** Número de galinhas positivas e negativas pela técnica da PCR comparando aves vacinadas e não vacinadas com vacinas vetorizadas (HVT ou FPV).

Número de aves	Positivas para o GaHV-1 pela PCR	Negativas para o GaHV- 1 pela PCR	Total
Vacinadas	40 (37%)	68 (63%)	108 (68%)
Não vacinadas	31(60%)	20 (40%)	51 (32%)
	71 (45%)	88 (55%)	Total: 159 aves (100%)

Na análise estatística utilizada (teste qui-quadrado), não houveram evidências para aceitar a hipótese nula de que os resultados observados quanto a positividade à PCR e vacinação fossem independentes, uma vez que o valor de  $p < 0,01$  (99%) foi encontrado, sugerindo então que a positividade de galinhas vacinadas é significativamente menor que nas aves não vacinadas contra a doença, no período avaliado de 2012 e 2013.

## 6. DISCUSSÃO

A LTI apresenta distribuição geográfica cosmopolita, sendo de ocorrência cíclica em áreas endêmicas, principalmente em áreas de alta densidade de produção (Guy e Garcia, 2008). A região da Mantiqueira possui 27 granjas, com aproximadamente 9,5 milhões de aves alojadas, que produzem quatro milhões de ovos por dia. É a segunda região de maior concentração de granjas e aves de postura de ovos comerciais do Brasil.

Durante o período de monitoramento (2012-2013), as galinhas de postura comercial das granjas avaliadas não apresentaram sinais ou lesões macroscópicas sugestivas de LTI. Entretanto, os episódios isolados evidenciaram que os sinais clínicos, lesões macroscópicas e histopatológicas observadas foram similares aos relatados para a doença (Guy et al., 1990). Apesar da existência dos casos isolados, as taxas de mortalidade apresentados pelos proprietários das granjas encontravam-se dentro da normalidade na maior parte do período avaliado.

Clinicamente, a LTI na forma severa é caracterizada por uma doença respiratória aguda com sinais que incluem secreção nasal sanguinolenta, espirros e dispnéia acentuada. A mortalidade pode variar entre 5 a 70% e a morbidade entre 90 e 100%. Sinais clínicos relacionados à forma branda enzoótica incluem diminuição da produção de ovos, conjuntivite, edema dos seios paranasais, traqueíte leve, descarga nasal persistente e conjuntivite (Timurkan et al., 2003, Guy e Garcia, 2008). As alterações macroscópicas da forma severa são caracterizadas principalmente por lesão fibrinocrótica nas mucosas respiratórias principalmente da laringe e traqueia (Beach, 1926; May e Tittler, 1925; Seifried, 1931; Hayashi et al., 1985, Sellers et al., 2004), conforme foi observado nos episódios relatados em aves não vacinadas. Como a taxa de mortalidade dos episódios isolados foi abaixo de 3% e a taxa média de mortalidade mensal nas granjas manteve-se

abaixo de 0,3%, sugere-se a forma menos severa para a LTI nas galinhas dessa região.

Em relação à histopatologia, quatro aves, das 159 galinhas avaliadas durante as visitas, foram incluídas na fase subaguda a crônica da LTI devido às características das lesões observadas. Segundo Purcell (1971) e Hayashi et al. (1985), na fase subaguda a crônica da doença, as células sinciciais não são mais observadas, pois ocorre descamação do epitélio de revestimento juntamente com essas células. Observa-se neste estágio da doença erosão da mucosa com exposição da lâmina própria e em alguns casos associação com exsudato necroticoseo. A observação de necrose associada a células sinciciais com corpúsculo de inclusão intranuclear na histopatologia podem ser utilizados para o diagnóstico da infecção pelo GaHV-1 (Crespo et al., 2007), sendo a ocorrência destes variável dependendo da evolução da doença (Hayashi et al., 1985). Assim, as lesões das quatro aves foram sugestivas, e não confirmatórias. Entretanto, em 18 aves (enviadas pelos veterinários do IMA) foram observadas lesões patognomônicas de LTI, sendo possível o diagnóstico final pela histopatologia. Segundo Purcell (1971) e Hayashi et al. (1985), na fase aguda da doença a traqueia pode apresentar: 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.

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). Nas aves do presente estudo que apresentaram lesões histológicas características de LTI, pode-se observar formação de sincícios a partir de células ciliadas e também de células não ciliadas e profundas da mucosa da traquéia, corroborando com a descrição anterior. No entanto, o mecanismo pelo qual o vírus induz a formação dos sincícios ainda não foi esclarecido. Possivelmente, a indução da fusão pode ocorrer dirigida pelo próprio GaHV-1, levando a interação de glicoproteínas do envelope viral com receptores da membrana das células, garantindo a sua replicação e disseminação (Herschke et al., 2007).

O diagnóstico diferencial da LTI com outras doenças respiratórias deve ser considerado devido à similaridade dos sinais clínicos e das lesões macroscópicas. Além disso, as infecções são favorecidas pelos sistemas de confinamento que criam condições ideais para a instalação e multiplicação de agentes infecciosos, fazendo com que uma ave apresente uma grande variedade de patógenos (Guy e Garcia, 2008). Para isso, além da observação criteriosa das lesões histológicas, devem-se utilizar técnicas complementares de diagnóstico, como detecção de material genético pela PCR. Lesões no aparelho respiratório sugestivas de outros agentes infecciosos foram observadas em 48 galinhas das 159 estudadas.

Foram encontradas lesões sugestivas de *Mycoplasma* spp. em 41 aves de postura comercial. Este agente causa sinais clínicos semelhantes às causadas pelo GaHV-1, 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 da mucosa respiratória, a infecção pela micoplasmose tem como característica a hiperplasia de folículos linfóides e o infiltrado linfoplasmocitário formando agregados semelhantes a folículos e o desaparecimento dos cílios, porém sem necrose e desprendimento do epitélio (Gaunson et al., 2000).

A presença da micoplasmose nas granjas de postura se deve provavelmente a inexistência de barreiras sanitárias adequadas, a um programa de vacinação deficiente, ou ainda a introdução de aves provindas de áreas livres de vacinação em granjas em que é realizada a vacinação. O menor número de aves positivas para *M. gallisepticum* e *M. synoviae* em 2013 podem estar relacionadas a vacinação uniforme de todas as aves para LTI. Essas bactérias podem manter-se viáveis por longos períodos, tornando possível a infecção de novos galpões. Uma das principais características das micoplasmoses, especialmente o *M. synoviae*, é a manifestação assintomática, podendo levar a imunossupressão do hospedeiro (Stipkovits e Kempf, 1996). O *Mycoplasma* spp. vem sendo reconhecido pela sua tendência de interagir com outros patógenos respiratórios, como a interação entre *M. gallisepticum* com vírus respiratórios e também com *Escherichia coli*, conhecida como doença respiratória crônica (DRC).

Seis aves apresentaram lesões compatíveis com bronquite infecciosa que é causada por um vírus membro da família *Coronaviridae*, que leva a uma doença respiratória altamente contagiosa e algumas vezes reprodutiva. A doença é caracterizada por sinais respiratórios, nefrite, diminuição da produção e qualidade dos ovos (Cavanagh, 1999). Feng et al., 2012, descreveu que ao exame microscópico dos tecidos traqueais, foram reveladas extensa necrose e degeneração das células epiteliais, com estruturas pseudoacinares (necrose individual de células) que resultavam da descamação das células para o lúmen, conforme foi observado nas amostras analisadas.

Uma ave apresentou lesões compatíveis com boubia aviária, doença causada por um poxvírus 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 indica se tratar de uma lesão causada por esse vírus (forma diftérica), já que esta é uma alteração característica e diagnóstica para a

doença (Silva et al., 2009). O poxvírus aviário na sua forma mais virulenta é caracterizado pela forma diftérica, que é facilmente confundido com LTI (Fatunmbi et al., 1995). Recentemente, novos casos de coinfeções envolvendo poxvírus aviário e GaHV-1 foram relatados (Diallo et al., 2010).

A histopatologia pode ser uma técnica altamente específica para o diagnóstico de LTI, no entanto, a sensibilidade da técnica pode ser baixa devido à descamação das células sinciciais com corpúsculo de inclusão nas fases subaguda a crônica da doença. Dessa forma, quando não são observadas lesões características de LTI, técnicas complementares de diagnóstico são de extrema importância, como o diagnóstico pela PCR.

A técnica da PCR, utilizando o par de *primers* que amplifica um produto de 237 pb mostrou bons resultados com relação a especificidade e sensibilidade. O gene ICP4 está presente na região longa (UL) do DNA viral e é formado por 4386 nucleotídeos. Desempenha um importante papel na regulação da expressão genômica no início da infecção e é usado em estudos epidemiológicos para distinção entre estirpes vacinais e estirpes de campo ou selvagens (Johnson et al., 1995; Chacón e Ferreira, 2009).

O GaHV-1, 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 vacinadas com vacinas vivas atenuadas também permanecem como carreadoras, 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 trigêmeo (Williams, 1992). No presente trabalho, foram submetidos à PCR 159 gânglios trigêmeos de aves de postura comercial, e interessantemente, todos foram negativos para a presença do genoma viral. Esse resultado sugere que as aves não se encontravam na condição de latência, provavelmente pelo baixo desafio viral e pelo efeito protetor das vacinas vectoradas.

O rápido diagnóstico etiológico das doenças respiratórias é essencial para um controle efetivo, entretanto torna-se desafiador devido à similaridade entre os sinais clínicos e as lesões macroscópicas induzidas pelos patógenos respiratórios. Além disso, usualmente mais de um agente pode estar envolvido no processo, tornando necessárias análises histopatológicas e microbiológicas adicionais para o diagnóstico final (Scholz et al., 1994, Yashpal et al., 2004). É fundamental lembrar que a detecção do antígeno pode não ser suficiente para o diagnóstico da doença e/ou morte. A detecção do agente utilizando PCR como único teste não confirma a ocorrência da doença, em vista da condição de portador ou latência, característica de alguns agentes (Scholz et al., 1994). Muitos dos agentes infecciosos respiratórios citados podem desenvolver estado de latência como o *Gallid herpesvirus* (Bagust, 1986) ou estado de portador como o *Mycoplasma gallisepticum* (Stipkovits e Kempf, 1996). Além disso, é imprescindível lembrar que vacinas vivas atenuadas podem produzir uma reação positiva pela PCR, dificultando sua interpretação, como descrito nas micoplasmoses (Nascimento et al., 2006, Armour et al., 2013).

Em vista disso, a associação desses resultados com a histopatologia torna-se fundamental, pois esta permite visualizar lesões que possam ser associadas com um determinado agente em questão. Dessa forma, a histopatologia indica a presença de inclusões patognomônicas, agentes infecciosos, ou lesões neoplásicas, indicando um diagnóstico conclusivo e os possíveis diagnósticos diferenciais nos casos em que não há definição. Além disso, muitas vezes a falha em detectar amostras positivas, mesmo quando as lesões histopatológicas são fortemente indicativas de determinado agente, poderia ocorrer devido a baixas concentrações de antígeno nas amostras analisadas, frequentemente observado nos estágios crônicos (Abbas e Andreasen, 1996; Williams et al., 1994).

Além da PCR, o sequenciamento de genes específicos tem sido realizado para melhor entendimento da doença em relação à

estirpe do agente infeccioso envolvido, esclarecendo a origem do agente de uma região ou país (Chacón e Ferreira, 2009). A estirpe viral envolvida no surto de LTI em Minas Gerais foi alinhada com depósitos de referência no *GenBank* buscando identificar mudanças nos nucleotídeos e aminoácidos. Todas as sequências obtidas foram idênticas entre elas, com 100% de identidade na análise de nucleotídeos. O gene ICP4 permitiu diferenciar as sequências obtidas das amostras vacinais CEO e TCO. As amostras analisadas não apresentaram a deleção nas regiões de 272 a 283 do gene ICP4, como observadas nas amostras vacinais (vacinas vivas atenuadas, CEO e TCO), que permite facilmente sua diferenciação de amostras selvagens. Além disso, outras amostras brasileiras incluídas no estudo (São Paulo e Sul do Brasil), também apresentaram diferenças significativas na sequência de nucleotídeos, sendo identificadas algumas mutações não sinônimas nas sequências analisadas que resultaram na mudança de aminoácidos. As sequências de aminoácidos deduzidas para ICP4 mostraram substituições de arginina (R) para a metionina (M) na posição 180 e alanina para valina na posição 209. As substituições de aminoácidos com diferentes propriedades físico-químicas (R) para (M) pode resultar em uma mudança estrutural na proteína ou em seu aspecto tridimensional (Barnes e Gray, 2003). No entanto, o significado biológico deste achado necessita de maior investigação.

A análise do gene TK também foi realizada buscando identificar mudanças nos nucleotídeos e aminoácidos quando as sequências encontradas foram alinhadas com depósitos de referência no *GenBank*. Amostras de baixa virulência tem uma treonina na posição 252 do gene TK, enquanto que cepas virulentas possuem uma metionina nessa posição (Han & Kim, 2001). As estirpes obtidas no estudo não apresentaram a mutação nessa região, sugerindo baixa patogenicidade para as amostras analisadas. De fato, embora as lesões nas aves que adoeceram tenham sido intensas, a taxa de mortalidade e morbidade foram baixas quando comparadas aos surtos com vírus de alta virulência, como os

descritos por Chacon e Ferreira, (2009) em São Paulo.

Chacon et al. (2010,) estabeleceu que o surto ocorrido em São Paulo em 2002, foi causado por um vírus altamente virulento não vacinal circulando simultaneamente com vírus tipo vacinais (CEO) e vírus selvagem de menor virulência. Diferentemente do observado pelos autores, os resultados apresentados sugerem que a origem do GaHV-1 no surto em Minas Gerais não foi causada por um vírus vacinal, mas sim por um vírus selvagem. A caracterização viral permitiu afirmar que o vírus encontrado no sul de Minas Gerais não é idêntico ao descrito para o surto ocorrido em 2002, em São Paulo.

Quando as árvores filogenéticas foram construídas, as estirpes obtidas no estudo foram agrupadas separadas das vacinas CEO e TCO e também de outras amostras brasileiras, tanto para os genes ICP4 como para o gene TK. Assim, a origem do vírus na região ainda permanece desconhecida, embora um vínculo epidemiológico com o Estado vizinho não poderia ser excluído, uma vez que aves de ambas as áreas foram rotineiramente transportados para um matadouro comum na época do surto em Minas Gerais. No entanto, considerando que nem todas as estirpes isoladas de surtos de São Paulo (Bastos e Guatapará) foram caracterizadas geneticamente, um quadro epidemiológico mais completo só poderia ser obtido comparando sequências do surto de Minas Gerais com isolados de todos os surtos de São Paulo.

Nenhum sinal clínico ou lesão compatível com a LTI foi descrito anterior a outubro e novembro de 2010 nas 27 granjas da área isolada, data em que, simultaneamente, a maioria das granjas da região apresentou aves com sinais e lesões típicas da doença. Evidências da presença anterior do GaHV-1 causando doença em aves da região, não foram encontradas. Estudos utilizando amostras de aves mostrando doença clínica respiratória em julho de 2010, cerca de quatro meses antes do surto foram feitas e, embora limitado a uma granja da região (Preis, 2013a), o GaHV-1 não foi detectado pela PCR.

A possibilidade da presença do vírus na região e alguma condição de biossegurança inadequada ou ainda a ocorrência de uma mutação dos vírus de São Paulo, parece improvável para explicar a origem do vírus, uma vez que a análise molecular revelou que o vírus não apresentou mutações em pelo menos dois fragmentos do gene ICP4 e um fragmento do gene TK por três anos consecutivos. Assim, a introdução do vírus pela primeira vez na região no momento do surto (Novembro de 2010) parece ser a hipótese mais provável de ser considerada. Por outro lado, a primeira detecção do vírus no Brasil foi feita em 1974 por Hipólito et al., em um granja do Rio de Janeiro, e, posteriormente, desapareceu ou permaneceu em silêncio por anos, sugerindo que o vírus poderia estar presente sem ser detectado em regiões vizinhas.

O método de criação das granjas, mantendo as aves em vários andares, e em grande concentração, somado à manutenção de grupos de aves em várias idades, e por um longo período de tempo durante a produção, são condições que oferecem a oportunidade de linhagens da vacina viva atenuada reverter a virulência (Oldoni e Garcia, 2007). Considerando esse risco de introdução de diversidade genética através de vírus vacinais na região, o MAPA autorizou apenas o uso de vacinas vectoradas para controlar a doença e para a prevenção de novos casos na região.

Assim, as vacinas vectoradas foram adotadas no Brasil, e como começou a ser testada pela primeira vez nessa região, tornou-se extremamente importante o acompanhamento para detectar o comportamento dos níveis de atividade viral das granjas do foco. De acordo com os resultados obtidos por PCR, houve uma tendência de diminuição de aves infectadas (positivas para GaHV-1), após a introdução das vacinas de LTI vectoradas HVT e/ou FPV. De 2012 a 2013, houve uma redução de aproximadamente 40% no número de aves positivas para GaHV-1. Durante esses dois anos de estudo, as aves não apresentaram sinais clínicos ou variação nas taxas de mortalidade ou na produção de ovos em galinhas vacinadas, o que sugere que os procedimentos de vacinação

implementados, associados a outras medidas complementares tomadas têm sido eficazes no controle da doença.

Em um estudo feito por Johnson et al. (2010), em regiões com forte desafio viral, as vacinas recombinantes falharam em garantir proteção contra a doença, entretanto em regiões com desafio viral leve a moderado, essas vacinas foram eficientes. Segundo Tong et al. (2001), a vantagem dessa vacina é a sua ausência de transmissão de ave para ave e, dessa forma, não sendo responsável por infecção latente ou reversão de virulência.

Em todos os gânglios trigêmeos examinados, não foi detectado DNA viral. Este resultado poderia levantar a hipótese de que a vacina poderia evitar uma infecção latente. Além disso, aparentemente, a vacinação não protege todas as aves da infecção. No presente estudo, foi observado que a traqueia, tanto de aves vacinadas como não vacinadas foram positivas para o GaHV-1, embora aves vacinadas positivas ocorreram em proporções menores e não associadas a lesões indicativas da doença causada pelo agente em questão.

A ausência de aves com sinais clínicos ou com lesões da LTI evidenciaram que a vacina vectorada é eficaz em gerar uma resposta do sistema imunológico das aves, uma vez que evita que a ave apresente a doença clínica, além disso, como citado anteriormente, sugere que o vírus não consiga realizar latência no gânglio do nervo trigêmeo. Anteriormente, resultados positivos na PCR para GaHV-1 nos gânglios do nervo trigêmeo foram obtidos a partir de galinhas com lesões de LTI descritos em 2011, aves estas coletadas antes da introdução da vacina vectorada (Preis et al., 2013b), bem como a partir de galinhas de subsistência sem doença clínica (Preis, 2013a) da região.

Embora a região não tenha mais apresentado surtos de LTI, ficou claro pelos resultados obtidos que o vírus ainda encontra-se presente, e circulante entre as aves e granjas. Esta condição foi detectada quando foram introduzidas aves provenientes de uma região em que não era



realizada a vacinação para o GaHV-1, e estas apresentaram sinais graves de doença respiratória aguda, sendo o diagnóstico posteriormente confirmado para LTI, demonstrando que há aves que permanecem infectadas e com capacidade de transmissão dos vírus.

É importante ressaltar ainda que todos os isolados obtidos não apresentaram diferenças entre suas análises de nucleotídeos, de 2011 a 2013, evidenciando que o vírus permaneceu estável ao longo de três anos, inclusive o DNA amplificado e sequenciado dos casos enviados pelo IMA mostrou-se idêntico ao das aves coletadas nas coletas de maio de 2012 e abril de 2013. Considerando-se que galinhas de subsistência foram positivas na região em estudos anteriores, é de fato, importante que se introduza a vacinação obrigatória também em aves de subsistência, uma vez que estes podem atuar como reservatório e fonte de infecção para galinhas comerciais.

A vacina ideal para LTI seria aquela de baixo custo e que conseguisse assegurar uma proteção uniforme em todo o galpão. A vacina ideal evitaria a latência, teria uma prevenção completa para a replicação viral, impedindo a infecção e transmissão entre as aves, o que seria fundamental para o controle e erradicação da doença. Coppo et al., (2013), afirma que mesmo com os mais recentes avanços no desenvolvimento de vacinas ainda não se atingiu o ideal, porém, os avanços tornaram o controle mais viável. Além disso, uma abordagem combinada, em que diferentes tipos de vacina são utilizadas em sinergismo, melhora o efeito de proteção induzido individualmente pelas vacinas.

No presente estudo, com base na histopatologia foi observada uma alta ocorrência da micoplasmose (*M. gallisepticum* e *M. synoviae*), demonstrada pela observação das lesões características e pela detecção do DNA viral de aves positivas pela PCR. As aves podem apresentar-se na condição de portadoras (Scholz et al, 1994), e para isso deve-se associar o resultado molecular a histopatologia, que deve apresentar lesões compatíveis com o agente etiológico

pesquisado. Por outro lado, no caso de estudos epidemiológicos em que seja necessário determinar a origem no microrganismo, ou realizar a diferenciação de estirpes vacinais (vacinas vivas atenuadas) de estirpes selvagens, o sequenciamento deve ser utilizado (Nascimento et al, 2006; Armour et al., 2013).

Para a caracterização molecular do *Mycoplasma gallisepticum*, foram selecionadas seis galinhas, três de 2011, uma de 2012 e duas de 2013, que apresentaram lesões histológicas compatíveis com *Mycoplasma gallisepticum* e que foram positivas pela PCR. Adicionalmente, uma amostra vacinal (MG-70 (BIOVET®)), administrada frequentemente nas granjas de avicultura do Brasil, também foi analisada. Armour et al. (2013), descreveu que o sequenciamento de múltiplas regiões, e em particular a região intergênica (IGSR) e um fragmento do gene *mgc2* possuem um alto poder discriminatório para caracterização de diferentes estirpes.

A análise da região intergênica possibilitou a identificação de três estirpes diferentes. Das três estirpes, duas foram caracterizadas como sendo selvagens e uma vacinal (2012/1), idêntica à estirpe F originada dos Estados Unidos. Curiosamente, não se obteve amplificação das amostras extraídas em 2013, podendo o fato estar relacionado a uma mutação ou deleção da região alvo (IGSR) delineada para a PCR.

Da mesma forma, as mesmas sete amostras também foram analisadas para um fragmento do gene *mgc2*, e cinco diferentes estirpes foram caracterizadas, sendo quatro selvagens. Pela análise do fragmento do gene *mgc2*, foi evidenciado identidade de 100% da amostra 2012/1 com uma estirpe de origem vacinal (F). É importante destacar, que mesmo tendo sido detectadas grande variedade de diferenças nucleotídicas que determinaram diferenças em aminoácidos entre as diferentes amostras analisadas, entretanto, é possível que mudanças em nucleotídeos de sítios particulares não resultem em diferentes estirpes (Amour et al., 2013).

De acordo com o resultado apresentado, uma das seis amostras foi identificada como sendo de origem vacinal. A ave que apresentou este resultado apresentava lesões histopatológicas de micoplasmose, podendo ser um caso de reversão de patogenicidade, em que o agente vacinal estaria sendo responsável por doença (Gaunson et al., 2006). Por outro lado, deve-se considerar a resposta vacinal, a qual pode levar ao aumento do infiltrado inflamatório na lâmina própria da mucosa respiratória. No entanto, o desafio gerado pelos antígenos vacinais não resultam em formações intensas (Gaunson et al. 2005), como as observadas nesta ave.

No caso das outras cinco aves em que foi realizado o sequenciamento para *M. gallisepticum*, foram obtidas diferentes estirpes, não associadas a estirpes vacinais. As amostras de 2011 eram provenientes de uma granja de recria que não realizou a vacinação para micoplasmose, portanto as três amostras de 2011 eram de aves não vacinadas para micoplasmose. As amostras de 2012 e 2013 foram obtidas de granjas em que as aves foram vacinadas para o *M. gallisepticum* (estirpes F e MG-70). Sendo assim, os casos de 2011 provavelmente se tratavam de infecção pelo patógeno quando as aves não vacinadas foram introduzidas na granja, o que levou as aves a desenvolverem as lesões, que variavam de moderadas e intensas. Entretanto, para as aves de 2012 e 2013 vacinadas para *M. gallisepticum*, pode-se relacionar a alta variação genética entre as estirpes de *M. gallisepticum*, sugerindo que a vacinação utilizada não garante proteção cruzada contra as diferentes estirpes (Amour et al., 2013). A galinha é o hospedeiro primário e natural do GaHV-1. Alguns trabalhos têm descrito a doença também em faisões e pavões (Graham & Boycott, 1981) e em perus (Portz et al., 2008). Outras espécies, mesmo proximamente relacionadas aos galiformes, não são susceptíveis. Os patos têm sido descritos como refratários a infecção pelo GaHV-1, porém, em um estudo feito por Yamada et al., (1980), demonstraram que estes podem ser infectados subclínicamente, sugerindo que podem ser susceptíveis a uma infecção experimental pelo GaHV-1.

Não há na literatura informações sobre a possível infecção das codornas pelo GaHV-1, e acredita-se que estas também sejam refratárias. O estudo da presença do vírus nestas espécies é particularmente importante, uma vez que estas são criadas muito próximas das granjas de galinhas poedeiras, inclusive coexistindo em uma mesma granja. No presente estudo, as codornas foram avaliadas quanto à presença de lesões para LTI assim como para o DNA viral. Todas as 19 codornas avaliadas não apresentaram lesões e foram negativas para o DNA viral, sugerindo que estas não tenham participação no processo de manutenção do vírus na região da Mantiqueira.

A profilaxia da laringotraqueíte requer a cooperação entre as granjas localizadas no foco e órgãos governamentais. Para Bagust (1995), o controle da LTI inicia-se com o diagnóstico precoce, uso de um programa de vacinação e prevenção do vírus. Devem ser adotados cuidados como higiene, vazios sanitário, cuidados com objetos, equipamentos e veículos potencialmente contaminados, além do controle de roedores e cães. O programa de vacinação deve ser uniforme para evitar a infecção de aves susceptíveis e a ocorrência da doença clínica. Apesar de não haver possibilidade de infecção para espécies de aves como garças e pardais, e mamíferos como gatos, estes foram constantemente observados circulantes por entre os galpões, havendo o risco da transmissão mecânica.

As medidas de biossegurança devem ser adotadas e visam reduzir, minimizar ou impedir oportunidades de disseminação do agente etiológico. Com a notificação do surto ao MAPA, houve a interdição da região, impedindo a movimentação das aves para áreas ou granjas livres. Além disso, existe a limitação para o trânsito de aves de descarte para outras regiões, devendo ser abatidas dentro da área interdita ou o mais próximo possível. Ficou demonstrado ainda que há a presença de aves de subsistência positivas para o GaHV-1 na região, indicando que estas também devem ser vacinadas, uma vez que podem funcionar como uma fonte de infecção para as aves de produção industrial.

## 7. CONCLUSÕES

- O surto de LTI ocorrido no sul de Minas Gerais em novembro de 2010 encontra-se controlado, uma vez que com a introdução da vacinação não ocorreram surtos significativos, onde houve uma redução do número de aves positivas em 40% do ano de 2012 para 2013;
- O vírus ainda encontra-se presente na região, que ficou evidenciado pela detecção do DNA viral na PCR, e também, pelos episódios isolados ocorridos com a introdução de aves não vacinadas, demonstrando que as aves encontram-se infectadas e com possibilidade de transmissão para aves susceptíveis;
- O alinhamento das sequências obtidas no estudo do gene ICP4, demonstram que os vírus de Minas Gerais não foram idênticos aos vírus caracterizados no surto de São Paulo, demonstrando também que o vírus não teve origem de vacinas vivas atenuadas utilizadas nesse surto;
- A origem do vírus ainda permanece desconhecida, apesar de que a proveniência do vírus do estado vizinho não pode ser excluída;
- A taxa de mortalidade baixa aliada ao resultado do sequenciamento, que indicou a ausência da mutação no gene TK, sugere que o vírus seja de menor virulência;
- O trabalho demonstrou ainda a ocorrência de múltiplos patógenos respiratórios associados (coinfecções), e dentre estas a micoplasmose foi a principal doença observada, e com o sequenciamento de regiões específicas do genoma observou-se a infecção, mesmo em locais onde era feita a vacinação para a doença;
- A falha vacinal em garantir proteção às aves contra micoplasmose poderia ter relação com a alta variação genética entre as estirpes encontradas;
- Uma estirpe vacinal de *M. gallisepticum* foi detectada em uma galinha vacinada contra a doença, sugerindo um caso de reversão da patogenicidade ou reação vacinal intensa;
- A vacina vectorada contra LTI parece ter um importante papel no controle da infecção, reduzindo o número de aves positivas, porém não impedindo a infecção e transmissão. Sugere-se, também, que a vacina impede o estado de latência no gânglio trigêmeo das aves;
- Deve ser intensificado o programa de vacinação para LTI entre as granjas, tornando compulsória a vacinação de todas as aves, e em todas as granjas, inclusive uniformizando a idade. As aves de subsistência também poderão ser vacinadas, uma vez que os estudos comprovaram a existência do vírus na traqueia e gânglio trigêmeo, e que estas podem funcionar como local de manutenção do vírus.
- As codornas analisadas mostraram-se todas negativas à infecção pelo GaHV-1, sugerindo que estas não são sensíveis a infecção e doença, não sendo também resistentes;
- As medidas de profilaxia adotadas pela Defesa Sanitária Animal devem ser mantidas, mantendo a região interdita e fiscalizando a saída de aves da região.

## 8 . REFERÊNCIAS

- ABBAS F.; ANDREASEN J.R. Comparison of diagnostic test for Infectious laryngotracheitis. *Avian Dis.* v. 40, n. 2, p. 290-295, 1996.
- APPEL, M.J.G. Reversion to virulence of attenuated canine distemper virus in vivo and in vitro. *J. Gen. Virol.* v.41, p.385-393, 1978.
- ARAÚJO, L.M.G.; SILVA, R.C.F.; SANTOS, J.A.S. Ocorrência de laringotraqueíte infecciosa no Estado do Rio de Janeiro, comunicado técnico. *Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro – PESAGRO*, 1/3 (b), 1982.
- ARMOUR N.K.; LAIBINIS V.A.; COLLETT S.R.; et al. The development and application of a *Mycoplasma gallisepticum* sequence database. *Avian Pathol.* v.42, n.5, p.408-15, 2013.
- BAGUST, T.J. Laryngotracheitis (Gallid 1) herpesvirus infection in the chicken, Latency establishment by wild and vaccine strains of ILT virus. *Avian Pathol.* v.15, p. 581-595, 1986.
- BAGUST T.J.; JOHNSON M.A. Avian infectious laryngotracheitis: virus host interactions in relation to prospects for eradication. *Avian Pathol.* v.24, p.373-91, 1995.
- BARNES, M. R.; GRAY, I. C. Bioinformatics for geneticists. John Wiley & Sons Ltd, The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex PO19 8SQ, England, p.411, 2003.
- BEACH, J.R. Infectious bronchitis of fowls. *J Am Vet Med Assoc.*, v. 68, p. 570-580, 1926.
- 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.
- BRUGH, M. Highly pathogenic virus recovered from chickens infected with mildly pathogenic 1986 isolates of H5N2 avian influenza virus. *Avian Dis.* v.32: p.695-703. 1988.
- CANAL C.W.; LEÃO J.A.; ROCHA S. L.S.; et al. Isolation and characterization of *Ornithobacterium rhinotracheale* from chickens in Brazil. *Res. Vet. Sci.*, v.78, p.225–230, 2005.
- CANN, A.J.; G.C. SCHILD; J.W.ALMOND. Reversion to neurovirulence of the live-attenuated Sabin type 3 oral poliovirus vaccine. *Nucleic Acids Res.* v.12, p.7787-7792. 1984.
- CAVANAGH D.; MAWDITT K.; BRITTON P.; et al. Longitudinal field studies of infectious bronchitis virus and avian pneumovirus in broilers using type-specific polymerase chain reactions. *Avian Pathol.* v.28, p.593-605, 1999.
- CAVANAGH D.; MAWDITT K.; WELCHMAN D. B.; et al. Coronaviruses from pheasants (*Phasianus colchicus*) are genetically closely related to coronaviruses of domestic fowl (infectious bronchitis virus) and turkeys. *Avian Pathol.* v.31, p.81–93, 2002.
- CHACÓN, J.L.V.; BRANDÃO, P.E.B.; VILAREAL, L.Y.B.; et al. Survey of infectious laryngotracheitis outbreak in layer hens and differential diagnosis with other respiratory pathogens. *Brazil. J. Poult. Sci.*, v.9, p.61-67, 2007.
- CHACÓN, J.L.; FERREIRA, A.J. 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.

- CHANG, P.; LEE, Y., SHIEN, J.; et al. Rapid differentiation of vaccine strains and field isolates of infectious laryngotracheitis virus by restriction fragment length polymorphism of PCR products. *J. Virol. Methods.* v.66, p.179-186, 1997.
- CLAVIJO A.; ÉVA N. Differentiation of infectious laryngotracheitis virus strains by polymerase chain reaction. *Avian Dis.* v.41, p.241-6, 1997.
- COPPO, M.J.C.; DEVLIN, J.M.; NOORMOHAMMADI, A.H. Comparison of the replication and transmissibility of an infectious laryngotracheitis virus vaccine delivered via eye-drop or drinking-water. *Avian Pathol.* v.41(1), p.99-106, 2012.
- COPPO M.J.C.; HARTLEY C.A.; DEVLIN, J.M. Immune responses to infectious laryngotracheitis virus. *Developmental and Comparative Immunology.* v.41, p.454-462, 2013.
- COVER M.S. The early history of infectious laryngotracheitis. *Avian Dis.* v.40, p.494-500, 1996.
- COWDRY, E.V. The problem of intranuclear inclusions in virus diseases. *Arch. Pathol.*, 18, p. 527-542, 1934.
- 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.
- DAVISON, S. E; GINGERICH, N.S; CASAVANT, R.J. Evaluation of the efficacy of a live fowlpox-vectored infectious laryngotracheitis/avian encephalomyelitis vaccine against ILT viral challenge. *Avian Dis.* v.50, p.50-54, 2006.
- DEVLIN J. M.; BROWNING G. F.; GILKERSON, J. R. A. Glycoprotein I- and glycoprotein E-deficient mutant of infectious laryngotracheitis virus exhibits impaired cell-to-cell spread in cultured cells. *Arch. Virol.*v.151, p.1281-1291, 2006a.
- DEVLIN, J. M.; BROWNING, G. F.; HARTLEY, C. A.; et al. Glycoprotein G is a virulence factor in infectious laryngotracheitis virus. *J. Gen. Virol.* v.87, p.2839-2847, 2006b.
- DIALLO I.S.; TAYLOR J.; GIBSON J.; et al. Diagnosis of a naturally occurring dual infection of layer chickens with fowlpox virus and gallid herpesvirus 1 (infectious laryngotracheitis virus). *Avian Pathol.* v.39(1), p.25-30, 2010.
- 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.
- FATUNMBI, O. O.; REED, W. M.; SCHWARTZ, D. L.; et al. Dual infection of chickens with pox and infectious laryngotracheitis (ILT) confirmed with specific pox and ILT DNA dot-blot hybridization assays. *Avian Dis.* v.39, p.925-930, 1995.
- FERGUSON, N.M.; HEPP, D.; SUN, S.; et al. Use of molecular diversity of *Mycoplasma gallisepticum* by gene-targeted sequencing (GTS) and random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis for epidemiological studies. *Microbiol.* v.151, p.1883-1893, 2005.
- 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.; WIESNER, D.; VEITS, J.; et al. In vitro and in vivo relevance of infectious laryngotracheitis virus gJ proteins that are expressed from spliced and nonspliced mRNAs. *J. Virol.* v.79, p.705-716, 2005.
- FUCHS, W.; VEITS, J.; HELFERICH, D.; et al. Molecular biology of avian infectious

- laryngotracheitis virus. *Vet. Res.* v.38, p.261–279, 2007.
- GARCIA, M.; RIBLET, S.M. Characterization of infectious laryngotracheitis virus (ILT) isolates: Demonstration of viral subpopulations within vaccine preparations. *Avian Dis.* v.45, p.558-566, 2001.
- 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.
- GAUNSON J.E.; PHILIP C.J.; WHITHEAR K.G.; et al. Age related differences in the immune response to *Mycoplasma gallisepticum*. *Vac.* v.6; n.24(10), p.1687-92, 2005.
- GAUNSON J.E.; PHILIP C.J.; WHITHEAR K.G.; et al. The cellular immune response in the tracheal mucosa to *Mycoplasma gallisepticum* in vaccinated and unvaccinated chickens in the acute and chronic stages of disease. *Vac.* v.24, p.2627–2633, 2006.
- 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.
- GIAMBRONE, J.J.; MACKLIN, K.S. Infectious laryngotracheitis vaccine virus detection in water lines and effectiveness of sanitizers for inactivating the virus. *Poult Sci Asso. Inc.* 2011.
- GRAHAM J.C.; BOYCOTT, B.R. Infectious Laryngotracheitis in Peafowl and Pheasants. *Avian Dis.* v.26 (2), 1981.
- GRAHAM, D.A.; MCLAREN, I.E.; CALVERT, V.; et al. RFLP analysis of recent Northern Ireland isolates of infectious laryngotracheitis virus: comparison with vaccine virus and field isolates from England, Scotland and the Republic of Ireland. *Avian Pathol.* v.29, p.57–62, 2000.
- GRIFFIN A.M.; BOURSNEILL M.E. Analysis of the nucleotide sequence of DNA from the region of the thymidine kinase gene of infectious laryngotracheitis virus; potential evolutionary relationships between the herpesvirus subfamilies. *J. Gen. Virol.* v.71(4), p.841-850, 1990.
- GUY, J.S.; BARNES, H.J.; MUNGER, L.L.; et al. Restriction endonuclease analysis of infectious laryngotracheitis viruses: comparison of modified-live vaccine viruses and North Carolina field isolates. *Avian Dis.* v.33, p.316-323, 1989.
- 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., BARNES, H.J.; SMITH, L. Increased virulence of modified-live infectious laryngotracheitis vaccine virus following bird-to-bird passage. *Avian Dis.* v.35, p.348-355, 1991.
- GUY J.S.; BAGUST T.J. Laryngotracheitis. In: *Disease of poultry*, 11<sup>th</sup> ed. SAIF Y.M.; BARNES H.J.; GLISSON J.R.; FADLY A.M.; MC DOUGLAND L.R.; SWAYNE D.E. eds Iowa State University Press, Ames, IA. p.121-134, 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. Analysis of Korean strains of infectious laryngotracheitis virus by nucleotide sequences and restriction fragment length polymorphism. *Vet. Microbiol.* v.83, p.321–331, 2001.
- HANSON, L.E. Laryngotracheitis. In: *Disease of poultry*. Iowa State University. Press p.485-495, 1991.

- 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, 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. Isolamento e identificação do vírus da laringotraqueíte infecciosa das galinhas no Brasil. Congresso Brasileiro de Microbiologia, RJ, p.16, 1974.
- HOPKINS, S.R.H.W.; YODER, J.R. Increased incidence of airsacculitis in broilers infected with *Mycoplasma synoviae* and chicken-passaged infectious bronchitis vaccine virus. *Avian Dis*. v.28, p.386-396. 1984.
- HUGHES, C.S.; 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, 1988.
- 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.
- 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.
- 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.
- KERNOHAN, G. Infectious laryngotracheitis in fowls. *J Am Vet Med Assoc.*, v. 78, p. 196-202, 1931.
- KHAN, M. I.; LAM, K. M.; YAMAMOTO, R. *Mycoplasma gallisepticum* strain variations detected by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. *Avian Dis*. v.31, p.315-320, 1987.
- KINGSBURY, F. W.; JUNGHERR, E. L. Indirect transmission of infectious laryngotracheitis in chickens. *Avian Dis* v. 2, n. 1, p. 54-63, 1957.
- KLEVEN, S. H.; MORROW, C. J.; WHITHEAR, K. J. Comparison of *Mycoplasma gallisepticum* strains by hemagglutination-inhibition and restriction endonuclease analysis. *Avian Dis*. v.32, p.731-741, 1988.
- LAUERMAN L.H.; HOERR F.J.; SHARPTON A.R.; et al. Development and application of a polymerase chain reaction assay for *Mycoplasma synoviae*. *Avian Dis*. v.37(3), p.829-34, 1993.
- LEY, D. H. *Mycoplasma gallisepticum* infection. In: FADLY, A. M.; GLISSON, J. R.; MCDUGALD, L. R.; et al. *Diseases of Poultry*. Ed. 1. Iowa: Blackwell Publishing, p. 807-867, 2008.
- LIANG, X. P.; BABIUK, L. A.; VAN DEN HURK S. D.; et al. Bovine herpesvirus 1 attachment to permissive cells is mediated by its major glycoproteins gI, gIII, and gIV. *J. Virol*. v.65, p.1124-1132, 1991.
- LINARES, J.A.; BICKFORD, A.A.; COOPER, G.L.; et al. An outbreak of infectious laryngotracheitis in California broilers. *Avian dis*. v.38, 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.
- METTENLEITER, T. C.; RAUH, I. A glycoprotein gX- $\beta$ -galactosidase fusion gene as insertional marker for rapid identification of pseudorabies virus mutants. *J. Virol. Meth.* V.30, p.55-66, 1990.
- MEULEMANS, G.; HALEN, P. Some physico-chemical and biological properties of a Belgian strain (u 76/1035) of infectious

- laryngotracheitis virus. *Avian path.*, v. 7, p. 311-315, 1978.
- MOHAMED Y. S.; MOORHEAD P. D.; BOHL E. H. Preliminary observations on possible synergism between infectious laryngotracheitis virus and hemophilus gallinarum. *Avian Dis.* v.13, n.1, p. 158-162, 1969.
- MORENO, A.; PICCIRILLO, A.; MONDIN, A.; et al. Epidemic of Infectious Laryngotracheitis in Italy: Characterization of Virus Isolates by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism and Sequence Analysis. *Avian dis.* v.54, p.1172-1177, 2010.
- NASCIMENTO, E. R.; YAMAMOTO, R.; KHAN, M. *Mycoplasma gallisepticum* F-vaccine strain-specific polymerase chain reaction. *Avian Dis.* v.37, p.203-211, 1993.
- NASCIMENTO E.R.; POLO P.A.; PEREIRA V.L.A.; et al. Serologic Response of SPF Chickens to Live Vaccines and other Strains of *Mycoplasma gallisepticum*. *Rev. Bras. Cienc.* v. 8, n. 1, p.45-50, 2006.
- NEFF C.; SUDLER A.C.; HOOP R.K. Characterization of Western European Field Isolates and Vaccine Strains of Avian Infectious Laryngotracheitis Virus by Restriction Fragment Length Polymorphism and Sequence Analysis. *Avian Dis.* v.52, p.278-283, 2008.
- OIE Terrestrial Manual 2008, Chapter 2.3.5. – Avian mycoplasmosis (*Mycoplasma gallisepticum*, *M. synoviae*).
- OKAZAKI, O. Proteolytic cleavage of glycoprotein B is dispensable for in vitro replication, but required for syncytium formation of pseudorabies virus. *J. Gen.Virol.* v.88, p.1859-1865, 2007.
- 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 Path.*, v. 36, n. 2, p. 167-176, 2007.
- OJKIC D.; SWINTON J.; VALLIERES M.; et al. Characterization of field isolates of infectious laryngotracheitis virus from Ontario. *Avian Pathol.* v.35, n.4, p.286-292, 2006.
- OTIM M.O.; MUKIIBI-MUKA G.; CHRISTENSEN H.; et al. Aflatoxicosis, infectious bursal disease and immune response to Newcastle disease vaccination in rural chickens. *Avian Pathol.* v. 34, n. 4, p. 319-323, 2005.
- PANG, Y. H.; WANG, T.; GIRSHICK, Z. X.I.E.; et al. Development and application of a multiplex polymerase chain reaction for avian respiratory agents. *Avian Dis.* v.46, p.691-699, 2002.
- PORTZ, C.; BELTRÃO, N.; FURIAN, T, Q. et al. Natural infection of turkeys by infectious laryngotracheitis virus. *Vet Microbiol.* v.131, p. 57-64, 2008.
- PREIS, I. S. Achados patológicos e aspectos moleculares do vírus da laringotraqueite infecciosa em galinhas no Sul de Minas Gerais. Dissertação de Mestrado. p. 64. 2013a. [www.bibliotecadigital.ufmg.br](http://www.bibliotecadigital.ufmg.br).
- PREIS, I.S.; BRAGA J.F.V.; COUTO, R.M.; et al. Outbreak of infectious laryngotracheitis in large multi-age egg layer chicken flocks in Minas Gerais, Brazil. *Pesq. Vet. Bras.* v.33, n.5, p.591-596, 2013b.
- 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.
- PURCELL D.A. The ultrastructural changes produced by infectious laryngotracheitis virus in tracheal epithelium of the fowl. *Res Vet Sci*; v.12, p.455-458, 1971.
- RAVIV, Z.; CALLISON, S.; FERGUSON-NOEL, N.; et al. The *Mycoplasma gallisepticum* 16S-23S rRNA intergenic spacer region sequence as a novel tool for



- epizootiological studies. *Avian Dis.* v.51, p.555-560, 2007.
- 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, 1967.
- RODRIGUEZ-AVILA, A.; OLDONI, I.; RIBLET, S.; et al. Replication and transmission of live attenuated infectious laryngotracheitis vírus (ILTV) vaccines. *Avian Dis* v.51, p.905-911, 2007.
- RODRIGUEZ-AVILA, A.; OLDONI, I.; RIBLET, S.; et al. Evaluation of the protection elicited by direct and indirect exposure to live attenuated infectious laryngotracheitis vírus vaccines against a recent challenge strain from the United States. *Avian Pathol*, v.37; p.287-292, 2008.
- ROIZMAN, B.; KNIPE, D. M. Herpes simplex viruses and their replication, In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Eds.), *Fields Virology*. Lippincott Williams e Wilkins, Philadelphia, p. 2399-2459, 2001.
- SADEGHI, M.; BOZORGEMEHRIFARD, M.H.; KEYVANFAR, H.; et al. Differentiation of field isolates and vaccine strains of infectious laryngotracheitis virus by DNA sequencing. *Afr. J. Microbiol. Res.* v. 5, n.24, p.4112-4117, 2011.
- 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.
- SÃO PAULO (Estado). Coordenadoria de Defesa Agropecuária. Portaria CDA Nº 2 de 10/01/2003. Fica proibida a emissão de GTA e o trânsito interestadual de aves de postura adultas para qualquer finalidade, oriundos dos municípios do Escritório de Defesa Agropecuária de Tupã, 2003.
- SCHOLZ, E.; PORTER, R.E.; GUO, P. Differential diagnosis of infectious laryngotracheitis from other avian respiratory disease by PCR procedure. *J. virol methods.* v.50, p.313-322, 1994.
- SELLERS, H.S.; GARCIA, M.; GLISSON, J.R.; et al. Mild infectious Laryngotracheitis in broilers in the Southeast. *Avian Dis.* v.48, p.430-436, 2004.
- SEIFRIED, O. Histopathology of infectious laryngotracheitis In chickens. *J. Exp. Med.*, v. 54, n. 6, p. 817-826, 1931.
- 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.; OLESIUK, O. M.; HELMBOLDT, C.F. Isolates of infectious laryngotracheitis which produce pneumonitis and airsacculitis. *Avian Dis.*, v. 16, n. 2, p. 278-84, 1971.
- STIPKOVITS L.; KEMPFT I. Mycoplasmosis in poultry. *Rev. Off. Int. Epizoot.* V.15, p.1495-1525, 1996.
- 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.175-80, 2003.
- TONG, G.Z.; ZHANG, S.J.; MENG, S.S.; et al. Protection of chickens from infectious laryngotracheitis with recombinant fowlpox virus expressing glycoprotein B of infectious laryngotracheitis virus. *Avian Pathol.* v.30, p.143-148, 2001.
- UBABEF (União Brasileira de Avicultura). História da avicultura no Brasil, 2010. Disponível em <[http://www.ubabef.com.br/a\\_avicultura\\_brasil/historia\\_da\\_avicultura\\_no\\_brasil](http://www.ubabef.com.br/a_avicultura_brasil/historia_da_avicultura_no_brasil)>. Acesso em dez. 2013.
- VOLGELSTREIN B.; GILLESPIE D. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci U S A.* v.76, n.2, p.615-619, 1979.

YAMADA S.; MATSUO K.; FUKUDA T.;  
et al. Susceptibility of ducks to the virus of  
infectious laryngotracheitis. *Avian  
Dis.* v.24, n.4, p.930-938, 1980.

YASHPAL S.M.; DEVI P.P.; SAGAR  
M.G. Detection of three avian respiratory  
viruses by single-tube multiplex reverse  
transcription-polymerase chain reaction  
assay. *J. Vet. Diagn. Invest.* V.16; p.244-  
248, 2004.

WHITHEAR, K. G. Control of avian  
mycoplasmoses by vaccination. *Rev. Sci.  
Tech.* v.15, p.1527-1553, 1996.

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.

WILLIAMS R.A.; SAVAGE C.E.; JONES  
R.C. A comparison of direct electron  
microscopy, virus isolation and a DNA  
amplification method for the detection of  
Avian Infectious Laryngotracheitis Virus in  
field material. *Avian Pathol.* v.23, n.4,  
p.709-720, 1994.

## ANEXOS

### ANEXO 1 - 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:

---

---

---

---

---

---

---

---

**ANEXO 2 – Tabela resumida de lesões histológicas observadas correlacionadas ao achados moleculares e conclusão diagnóstica final.**

Número da ave	Idade	Macroscopia	Vacinação para VLT	Diagnóstico histopatológico	PCR GaHV-1	PCR MG	PCR MS	Conclusão
P105	24 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Sim	Traqueíte linfoplasmocitária difusa discreta.	-	-	-	Inespecífico
P106	24 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Sim	Traqueíte linfoplasmocitária difusa moderada.	+	+	+	Inespecífico
P107	24 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Sim	Traqueíte linfoplasmocitária difusa moderada.	-	-	-	Inespecífico
P108	24 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Sim	Traqueíte linfoplasmocitária difusa moderada.	-	-	-	Inespecífico
P109	24 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Sim	Traqueíte linfoplasmocitária difusa moderada com perda de cílios e achatamento do epitélio associado a formação linfolicular intensa.	-	+	-	Micoplasmose
P110	24 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Sim	Traqueíte linfoplasmocitária difusa moderada.	-	-	-	Inespecífico
P111	96 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Não	Sem alterações microscópicas.	-	-	-	Inespecífico
P112	96 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Não	Traqueíte linfoplasmocitária difusa moderada.	-	-	-	Inespecífico
P113	96 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Não	Traqueíte linfoplasmocitária difusa moderada.	+	+	+	Inespecífico
P114	96 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Não	Traqueíte linfoplasmocitária difusa moderada.	-	-	-	Inespecífico
P115	96 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Não	Traqueíte linfoplasmocitária difusa moderada.	-	-	-	Inespecífico
P116	96 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Não	Traqueíte linfoplasmocitária difusa discreta.	-	-	-	Inespecífico
P117	29 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Sim	Traqueíte linfoplasmocitária e heterofílica multifocal a coalescente moderada.	-	+	-	Inespecífico
P118	29 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Sim	Sem alterações microscópicas.	+	+	+	Inespecífica
P119	29 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Sim	Traqueíte linfoplasmocitária difusa moderada.	+	+	+	Inespecífica
P120	29 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Sim	Traqueíte linfoplasmocitária multifocal a coalescente discreta.	+	+	+	Inespecífica
P121	29 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Sim	Traqueíte linfoplasmocitária difusa moderada.	+	+	+	Inespecífica

Número da ave	Idade	Macroscopia	Vacinação para VLT	Diagnóstico histopatológico	PCR GaHV-1	PCR MG	PCR MS	Conclusão
P122	29 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Sim	Traqueíte linfoplasmocitária difusa intensa com perda multifocal de cílios e achatamento do epitélio associado a formação linfocelular discreta.	+	+	+	Micoplasmose
P123	31 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Sim	Traqueíte linfoplasmocitária difusa discreta.	+	+	+	Inespecífico
P124	31 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Sim	Traqueíte linfoplasmocitária difusa discreta.	+	+	+	Inespecífico
P125	58 semanas	Aumento de muco moderado.	Não	Traqueíte linfoplasmocitária difusa moderada.	-	-	-	Inespecífico
P126	58 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Não	Traqueíte linfoplasmocitária multifocal moderada com intensa hiperplasia epitelial focal e corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos eosinofílicos.	+	+	+	Bouba aviária
P127	109 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Não	Traqueíte linfoplasmocitária difusa moderada.	+	+	+	Inespecífico
P128	109 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Não	Traqueíte linfoplasmocitária difusa intensa com necrose individual de células, perda de cílios e achatamento do epitélio multifocal.	+	+	+	Bronquite infecciosa
P129	109 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Não	Traqueíte linfoplasmocitária difusa intensa com células sinciciais associada a perda de cílios, achatamento do epitélio multifocais e formações linfocelulares moderadas.	+	+	+	Laringotraqueíte / Micoplasmose
P130	109 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Não	Traqueíte difusa discreta com perda de cílios e achatamento do epitélio multifocais associado a formação linfocelular moderada.	+	+	-	Micoplasmose
P131	109 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Não	Traqueíte linfoplasmocitária difusa discreta.	+	+	+	Inespecífico.
P132	109 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Não	Traqueíte linfoplasmocitária difusa moderada crônica.	-	+	+	Inespecífico.
P133	15 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Sim	Traqueíte linfoplasmocitária difusa leve com achatamento de epitélio e perda de cílios multifocais associado a formação linfocelular moderada.	+	+	+	Micoplasmose.

Número da ave	Idade	Macroscopia	Vacinação para VLT	Diagnóstico histopatológico	PCR GaHV-1	PCR MG	PCR MS	Conclusão
P134	13 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Sim	Traqueíte linfoplasmocitária difusa moderada com perda de cílios e achatamento do epitélio multifocais associado a formação linfociliar intensa.	+	+	-	Micoplasmose.
P135	61 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Não	Traqueíte linfoplasmocitária difusa intensa com intensas formações linfociliares e perda de cílios multifocal.	+	+	-	Micoplasmose.
P136	61 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Não	Traqueíte linfoplasmocitária difusa moderada.	+	+	+	Inespecífico.
P137	61 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Não	Traqueíte linfoplasmocitária difusa moderada com perda de cílios e achatamento do epitélio multifocais associado a formação linfociliar discreta.	+	+	+	Micoplasmose.
P138	63 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Não	Traqueíte linfoplasmocitária difusa moderada com perda de cílios e achatamento do epitélio multifocais associada a formação linfociliar moderada.	-	-	+	Micoplasmose.
P139	63 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Não	Traqueíte linfoplasmocitária difusa moderada.	+	+	+	Inespecífico.
P140	63 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Não	Traqueíte linfoplasmocitária difusa discreta.	+	+	+	Inespecífico.
P141	27 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Sim	Traqueíte linfoplasmocitária difusa discreta.	+	+	+	Inespecífico
P142	27 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Sim	Traqueíte linfoplasmocitária difusa moderada com células sinciciais.	+	+	-	Laringotraqueíte infecciosa.
P143	27 semanas	Aumento moderado de muco.	Sim	Traqueíte linfoplasmocitária difusa discreta.	+	+	+	Inespecífico
P144	25 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Sim	Traqueíte linfoplasmocitária difusa moderada com perda de cílios e achatamento do epitélio multifocais associada a formação linfociliar moderada.	+	+	+	Micoplasmose
P145	25 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Sim	Traqueíte linfoplasmocitária difusa moderada.	+	+	+	Inespecífico.

Número da ave	Idade	Macroscopia	Vacinação para VLT	Diagnóstico histopatológico	PCR GaHV-1	PCR MG	PCR MS	Conclusão
P146	25 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Sim	Traqueíte linfoplasmocitária difusa moderada com perda de cílios e achatamento do epitélio multifocais associada a formação linfocelular moderada.	+	+	+	Micoplasmose.
P147	33 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Sim	Traqueíte linfoplasmocitária difusa discreta.	+	+	+	Inespecífico.
P148	33 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Sim	Traqueíte linfoplasmocitária difusa discreta com perda de cílios e achatamento do epitélio multifocais associada a formação linfocelular intensa.	-	-	-	Micoplasmose
P149	33 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Sim	Traqueíte linfoplasmocitária difusa moderada.	+	+	+	Inespecífico.
P150	61 semanas	Aerossaculite fibrinosa, com aderência pulmonar.	Não	Traqueíte linfoplasmocitária difusa moderada.	+	+	+	Inespecífico.
P151	61 semanas	Aerossaculite caseosa, hiperemia moderada da mucosa da traqueia com aumento discreto de mucó.	Não	Traqueíte linfoplasmocitária difusa intensa.	+	+	+	Inespecífico.
P152	61 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Não	Traqueíte linfoplasmocitária difusa discreta.	+	+	+	Inespecífico.
P153	57 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Não	Traqueíte linfoplasmocitária difusa moderada.	+	-	+	Inespecífico.
P154	57 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Não	Traqueíte linfoplasmocitária difusa discreta.	-	-	-	Inespecífico.
P155	57 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Não	Traqueíte linfoplasmocitária difusa moderada com células sinciciais.	+	-	+	Laringotraqueíte infecciosa.
P156	56 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Não	Traqueíte linfoplasmocitária difusa discreta.	-	-	-	Inespecífico.
P157	56 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Não	Traqueíte linfoplasmocitária difusa discreta.	+	+	+	Inespecífico.
P158	56 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Não	Traqueíte linfoplasmocitária difusa discreta.	+	-	+	Inespecífico.
P159	95 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Não	Traqueíte linfoplasmocitária difusa discreta.	-	-	-	Inespecífico.



Número da ave	Idade	Macroscopia	Vacinação para VLT	Diagnóstico histopatológico	PCR GaHV-1	PCR MG	PCR MS	Conclusão
P160	95 semanas	Hiperemia, muco e espessamento discreto da traqueia.	Não	Traqueíte linfoplasmocitária difusa moderada com perda de cílios e achatamento do epitélio multifocais associada a formação linfocelular moderada.	+	+	-	Micoplasmose.
P161	90 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Não	Traqueíte linfoplasmocitária multifocal discreta.	+	-	+	Inespecífico.
P162	90 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Não	Traqueíte linfoplasmocitária difusa discreta.	+	+	+	Inespecífico.
P163	90 semanas	Porção inicial da traqueia com hiperemia discreta.	Não	Traqueíte linfoplasmocitária difusa discreta com perda de cílios e achatamento do epitélio multifocais associada a formação linfocelular intensa.	+	-	+	Micoplasmose.
P164	90 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Não	Traqueíte linfoplasmocitária difusa discreta.	-	-	+	Inespecífico.
P165	35 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Sim	Traqueíte linfoplasmocitária difusa discreta.	-	-	+	Inespecífico.
P166	35 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Sim	Traqueíte linfoplasmocitária difusa moderada.	+	-	+	Inespecífico.
P167	35 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Sim	Traqueíte linfoplasmocitária difusa moderada com células sinciciais.	-	-	+	Laringotraqueite infecciosa.
P168	35 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Sim	Traqueíte linfoplasmocitária difusa discreta.	+	-	+	Inespecífico.
P169	40 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Sim	Traqueíte linfoplasmocitária difusa moderada com perda de cílios e achatamento do epitélio multifocais associada a formação linfocelular moderada.	+	+	+	Micoplasmose.
P170	40 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Sim	Traqueíte linfoplasmocitária difusa moderada.	+	+	+	Inespecífico.
P171	40 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Sim	Traqueíte linfoplasmocitária difusa moderada com perda de cílios e achatamento do epitélio multifocais com formação linfocelular moderada.	-	+	+	Micoplasmose.
P172	76 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Sim	Traqueíte linfoplasmocitária difusa moderada.	+	+	-	Inespecífico.
P173	76 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Não	Traqueíte linfoplasmocitária difusa discreta.	+	+	+	Inespecífico.

Número da ave	Idade	Macroscopia	Vacinação para VLT	Diagnóstico histopatológico	PCR GaHV-1	PCR MG	PCR MS	Conclusão
P174	76 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Não	Traqueíte linfoplasmocitária difusa discreta.	+	-	+	Inespecífico.
P175	15 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Sim	Traqueíte linfoplasmocitária difusa intensa com perda de cílios e achatamento do epitélio multifocais associado a formação linfocelular intensa.	-	-	-	Micoplasmose.
P176	15 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Sim	Traqueíte linfoplasmocitária difusa intensa com perda de cílios e achatamento do epitélio multifocais associado a formação linfocelular intensa.	-	-	-	Micoplasmose.
P177	15 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Sim	Traqueíte linfoplasmocitária difusa intensa com perda de cílios e achatamento do epitélio multifocais associado a formação linfocelular intensa.	-	-	-	Micoplasmose.
P178	15 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Sim	Traqueíte linfoplasmocitária difusa moderada.	-	-	-	Inespecífico.
P179	44 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Sim	Sem alterações microscópicas.	-	-	-	Inespecífico.
P180	44 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Sim	Traqueíte linfoplasmocitária difusa discreta.	-	-	-	Inespecífico.
P181	44 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Sim	Traqueíte linfoplasmocitária difusa discreta.	-	-	-	Inespecífico.
P182	29 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Sim	Traqueíte linfoplasmocitária difusa moderada.	+	-	-	Inespecífico.
P183	29 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Sim	Traqueíte linfoplasmocitária difusa discreta.	-	-	-	Inespecífico.
P184	29 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Sim	Traqueíte linfoplasmocitária difusa moderada.	+	-	-	Inespecífico.
P185	71 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Sim	Traqueíte linfoplasmocitária difusa discreta.	-	-	-	Inespecífico.
P186	71 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Sim	Traqueíte linfoplasmocitária difusa discreta.	-	-	-	Inespecífico.
P187	71 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Sim	Traqueíte linfoplasmocitária difusa discreta.	-	-	-	Inespecífico.
P188	72 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Sim	Traqueíte linfoplasmocitária difusa discreta.	-	-	+	Inespecífico.

Número da ave	Idade	Macroscopia	Vacinação para VLT	Diagnóstico histopatológico	PCR GaHV-1	PCR MG	PCR MS	Conclusão
P189	72 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Sim	Traqueíte linfoplasmocitária difusa moderada.	+	+	+	Inespecífico.
P190	72 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Sim	Traqueíte linfoplasmocitária difusa moderada.	-	-	-	Inespecífico.
P191	72 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Sim	Sem alterações microscópicas.	-	-	-	Inespecífico.
P192	38 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Não	Traqueíte linfoplasmocitária difusa discreta.	-	-	-	Inespecífico.
P193	38 semanas	Aumento de muco discreto na traqueia	Não	Traqueíte linfoplasmocitária difusa discreta.	-	+	+	Inespecífico.
P194	38 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Não	Traqueíte linfoplasmocitária difusa moderada.	-	-	-	Inespecífico.
P195	38 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Não	Traqueíte linfoplasmocitária difusa discreta.	-	-	-	Inespecífico.
P196	88 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Não	Traqueíte linfoplasmocitária difusa moderada com metaplasia escamosa focal.	-	+	+	Inespecífico.
P197	88 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Não	Traqueíte linfoplasmocitária difusa moderada com perda de cílios multifocal associado a formação linfolicular moderada.	+	+	+	Inespecífico.
P198	88 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Não	Traqueíte linfoplasmocitária difusa moderada.	+	+	+	Inespecífico.
P199	42 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Sim	Traqueíte linfoplasmocitária difusa moderada com perda de cílios e achatamento do epitélio multifocais associado a formação linfolicular moderada.	-	+	+	Micoplasmose.
P200	42 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Sim	Traqueíte linfoplasmocitária difusa moderada com perda de cílios e achatamento do epitélio multifocais associado a formação linfolicular discreta.	+	+	+	Micoplasmose.
P201	42 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Sim	Traqueíte linfoplasmocitária difusa intensa com perda de cílios e achatamento do epitélio multifocais associado a formação linfolicular intensa.	+	+	+	Micoplasmose.
P202	52 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Sim	Traqueíte linfoplasmocitária multifocal discreta.	+	+	+	Inespecífico.

Número da ave	Idade	Macroscopia	Vacinação para VLT	Diagnóstico histopatológico	PCR GaHV-1	PCR MG	PCR MS	Conclusão
P203	52 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Sim	Traqueíte linfoplasmocitária difusa discreta.	+	+	+	Inespecífico.
P204	52 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Sim	Traqueíte linfoplasmocitária difusa discreta.	+	+	+	Inespecífico.
P205	24 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Sim	Traqueíte linfoplasmocitária difusa moderada.	+	+	+	Inespecífico.
P206	24 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Sim	Traqueíte linfoplasmocitária difusa discreta.	-	+	+	Inespecífico.
P207	24 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Sim	Traqueíte linfoplasmocitária difusa moderada.	+	+	+	Inespecífico.
P208	92 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Não	Traqueíte linfoplasmocitária difusa moderada.	+	+	+	Inespecífico.
P209	92 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Não	Traqueíte linfoplasmocitária difusa discreta.	+	+	+	Inespecífico.
P210	92 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Não	Traqueíte linfoplasmocitária difusa intensa.	+	-	+	Inespecífico.
P211	22 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Sim	Traqueíte linfoplasmocitária difusa discreta.	+	+	+	Inespecífico.
P212	22 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Sim	Traqueíte linfoplasmocitária difusa discreta com perda de cílios e achatamento do epitélio multifocais associado a formação linfolicular discreta.	+	+	+	Inespecífico.
P213	22 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Sim	Traqueíte linfoplasmocitária difusa intensa com perda de cílios e achatamento do epitélio multifocais associado a formação linfolicular discreta.	-	+	+	Inespecífico.
P214	93 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Não	Traqueíte linfoplasmocitária difusa discreta.	+	+	+	Inespecífico.
P215	93 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Não	Traqueíte linfoplasmocitária difusa discreta.	-	-	-	Inespecífico.
P216	93 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Não	Traqueíte linfoplasmocitária multifocal discreta.	-	-	+	Inespecífico.
P217	93 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Não	Traqueíte linfoplasmocitária difusa discreta.	-	-	-	Inespecífico.

Número da ave	Idade	Macroscopia	Vacinação para VLT	Diagnóstico histopatológico	PCR GaHV-1	PCR MG	PCR MS	Conclusão
P218	40 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Sim	Traqueíte linfoplasmocitária difusa moderada com perda de cílios e achatamento do epitélio multifocais associado a formação linfocelular discreta.	-	-	-	Micoplasmose.
P219	40 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Sim	Traqueíte fibrinosa linfoplasmocitária difusa moderada com perda de cílios e achatamento do epitélio multifocais associado a formação linfocelular moderada.	-	-	-	Micoplasmose.
P220	40 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Sim	Traqueíte fibrinosa linfoplasmocitária difusa discreta.	-	-	-	Inespecífico.
P221	40 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Sim	Traqueíte linfoplasmocitária difusa moderada com perda de cílios e achatamento do epitélio multifocais associado a formação linfocelular moderada.	-	+	+	Micoplasmose.
P233	Não informado	Aumento de muco moderado.	Não	Traqueíte necro-fibrino-hemorrágica linfoplasmocitária e heterofílica difusa intensa com células sinciciais.	+	NR	NR	Laringotraqueíte infecciosa
P234	Não informado	Aumento de muco moderado e presença discreta de sangue	Não	Traqueíte necro-fibrino-hemorrágica linfoplasmocitária e heterofílica difusa intensa com células sinciciais.	+	NR	NR	Laringotraqueíte infecciosa
P235	Não informado	Aumento de muco moderado.	Não	Traqueíte necro-fibrino-hemorrágica linfoplasmocitária e heterofílica difusa intensa com células sinciciais e corpúsculos de inclusão intranucleares eosinofílicos.	+	NR	NR	Laringotraqueíte infecciosa
P236	Não informado	Aumento de muco moderado.	Não	Traqueíte necro-fibrino-hemorrágica linfoplasmocitária e heterofílica difusa moderada com células sinciciais.	+	NR	NR	Laringotraqueíte infecciosa
P237	Não informado	Aumento de muco moderado.	Não	Traqueíte necro-fibrino-hemorrágica linfoplasmocitária e heterofílica difusa moderada com células sinciciais.	+	NR	NR	Laringotraqueíte infecciosa
P238	Não informado	Aumento de muco discreto.	Não	Traqueíte linfoplasmocitária difusa discreta.	-	NR	NR	Inespecífico.

Número da ave	Idade	Macroscopia	Vacinação para VLT	Diagnóstico histopatológico	PCR GaHV-1	PCR MG	PCR MS	Conclusão
P239	Não informado	Presença acentuada de sangue ao longo da traqueia	Não informado	Traqueíte fibrino-hemorrágica linfoplasmocitária e heterofílica difusa intensa com células sinciciais e corpúsculos de inclusão intranuclear eosinofílicos.	NR	NR	NR	Laringotraqueíte infecciosa.
P240	Não informado	Presença acentuada de sangue ao longo da traqueia	Não informado	Traqueíte fibrino-hemorrágica linfoplasmocitária e heterofílica difusa moderada com células sinciciais.	NR	NR	NR	Laringotraqueíte infecciosa.
P241	Não informado	Presença de fibrina multifocal moderada, mucosa discretamente espessada	Não informado	Traqueíte necrótica linfoplasmocitária difusa moderada.	NR	NR	NR	Inespecífico.
P242	Não informado	Ausência de lesões macroscópicas	Não informado	Traqueíte fibrino-hemorrágica linfoplasmocitária e heterofílica difusa moderada com células sinciciais e corpúsculos de inclusão intranuclear eosinofílicos.	NR	NR	NR	Laringotraqueíte infecciosa
P243	Não informado	Presença de tampão caseoso na traqueia.	Não informado	Traqueíte fibrino-hemorrágica linfoplasmocitária e heterofílica difusa moderada com células sinciciais e corpúsculos de inclusão intranuclear eosinofílicos.	NR	NR	NR	Laringotraqueíte infecciosa
P244	Não informado	Presença de fibrina multifocal moderada.	Não informado	Traqueíte fibrino-hemorrágica linfoplasmocitária e heterofílica difusa moderada com células sinciciais e corpúsculos de inclusão intranuclear eosinofílicos.	NR	NR	NR	Laringotraqueíte infecciosa
P245	55 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Sim	Traqueíte linfoplasmocitária difusa moderada.	-	-	-	Inespecífico.
P246	55 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Sim	Traqueíte linfoplasmocitária difusa moderada com perda de cílios e achatamento do epitélio multifocais associado a formação linofolicular intensa.	-	+	-	Micoplasmose.
P247	55 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Sim	Traqueíte linfoplasmocitária difusa intensa com perda de cílios e achatamento do epitélio multifocais associado a formação linofolicular intensa.	-	+	-	Micoplasmose.

Número da ave	Idade	Macroscopia	Vacinação para VLT	Diagnóstico histopatológico	PCR GaHV-1	PCR MG	PCR MS	Conclusão
P248	55 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Sim	Traqueíte linfoplasmocitária difusa leve.	+	+	+	Inespecífico.
P249	55 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Sim	Traqueíte linfoplasmocitária difusa intensa com perda de cílios e achatamento do epitélio multifocais associado a formação linofolicular intensa.	-	-	+	Micoplasmose.
P250	55 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Sim	Traqueíte linfoplasmocitária difusa moderada com perda de cílios e achatamento do epitélio multifocais associado a formação linofolicular moderada.	-	-	+	Micoplasmose.
P251	30 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Sim	Traqueíte linfoplasmocitária difusa intensa com necrose individual de células.	-	-	-	Bronquite infecciosa.
P252	30 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Sim	Traqueíte linfoplasmocitária difusa discreta com perda de cílios e achatamento do epitélio multifocais associado a formação linofolicular moderada.	-	-	+	Micoplasmose.
P253	30 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Sim	Traqueíte linfoplasmocitária difusa moderada.	-	-	-	Inespecífico.
P254	30 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Sim	Sem alterações microscópicas.	-	-	-	Inespecífico.
P255	30 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Sim	Traqueíte linfoplasmocitária difusa discreta.	-	-	-	Inespecífico.
P256	30 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Sim	Traqueíte linfoplasmocitária difusa discreta.	-	-	-	Inespecífico.
P257	15 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Sim	Traqueíte linfoplasmocitária difusa intensa.	-	-	-	Bronquite infecciosa.
P258	15 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Sim	Traqueíte linfoplasmocitária difusa intensa com perda de cílios, achatamento do epitélio e formação linofolicular discreta associada a necrose individual de células.	-	+	-	Micoplasmose / Bronquite infecciosa.
P259	15 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Sim	Traqueíte linfoplasmocitária difusa intensa com necrose individual de células.	-	-	-	Bronquite infecciosa.
P260	15 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Sim	Sem alterações microscópicas.	-	-	-	Inespecífico.

Número da ave	Idade	Macroscopia	Vacinação para VLT	Diagnóstico histopatológico	PCR GaHV-1	PCR MG	PCR MS	Conclusão
P261	15 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Sim	Traqueíte linfoplasmocitária difusa intensa com necrose individual de células.	-	-	-	Bronquite infecciosa.
P262	15 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Sim	Sem alterações microscópicas.	-	-	-	Inespecífico.
P263	30 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Sim	Traqueíte linfoplasmocitária difusa moderada com perda multifocal dos cílios e achatamento do epitélio multifocais associado a formação linofolicular discreta.	-	-	-	Micoplasmose.
P264	30 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Sim	Traqueíte linfoplasmocitária difusa moderada com perda de cílios e achatamento do epitélio multifocais associado a formação linofolicular discreta.	-	+	+	Micoplasmose.
P265	30 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Sim	Traqueíte linfoplasmocitária difusa moderada.	-	-	-	Inespecífico.
P266	30 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Sim	Traqueíte linfoplasmocitária difusa intensa.	-	+	-	Inespecífico.
P267	30 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Sim	Traqueíte linfoplasmocitária difusa discreta.	+	+	-	Inespecífico.
P268	30 semanas	Aumento discreto de muco	Sim	Traqueíte linfoplasmocitária difusa moderada.	+	+	+	Inespecífico.
P269	105 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Sim	Traqueíte linfoplasmocitária multifocal a coalescente moderada.	-	-	-	Inespecífico.
P270	105 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Sim	Traqueíte linfoplasmocitária difusa moderada com perda de cílios e achatamento do epitélio multifocais associado a formação linofolicular discreta.	-	-	-	Micoplasmose.
P271	105 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Sim	Traqueíte linfoplasmocitária difusa moderada com perda de cílios e achatamento do epitélio multifocais associado a formação linofolicular discreta.	+	+	+	Micoplasmose.
P272	105 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Sim	Traqueíte linfoplasmocitária difusa discreta	-	-	-	Inespecífico.
P273	105 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Sim	Traqueíte linfoplasmocitária difusa discreta associado a formação linofolicular discreta.	-	-	-	Micoplasmose.



Número da ave	Idade	Macroscopia	Vacinação para VLT	Diagnóstico histopatológico	PCR GaHV-1	PCR MG	PCR MS	Conclusão
P274	105 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Sim	Traqueíte linfoplasmocitária difusa moderada com perda de cílios e achatamento do epitélio multifocais associado a formação linofolicular discreta.	-	-	-	Micoplasmose.
P275	40 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Sim	Traqueíte linfoplasmocitária difusa moderada com perda de cílios e achatamento do epitélio multifocais associado a formação linofolicular moderada.	-	+	-	Micoplasmose.
P276	40 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Sim	Traqueíte linfoplasmocitária difusa moderada com perda de cílios e achatamento do epitélio multifocais associado a formação linofolicular moderada.	-	-	-	Micoplasmose.
P277	40 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Sim	Traqueíte linfoplasmocitária difusa discreta.	-	-	-	Inespecífico.
P278	40 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Sim	Traqueíte linfoplasmocitária multifocal a coalescente discreta.	-	-	-	Inespecífico.
P279	40 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Sim	Traqueíte linfoplasmocitária difusa discreta.	-	-	-	Inespecífico.
P280	40 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Sim	Traqueíte linfoplasmocitária difusa discreta.	-	-	-	Inespecífico.
P281	36 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Sim	Sem alterações microscópicas.	-	-	-	Inespecífico.
P282	36 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Sim	Traqueíte linfoplasmocitária difusa discreta com perda de cílios e achatamento do epitélio multifocais associado a formação linofolicular moderada.	+	+	+	Micoplasmose.
P283	36 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Sim	Traqueíte linfoplasmocitária multifocal a coalescente discreta	-	-	-	Inespecífico.
P284	103 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Sim	Traqueíte linfoplasmocitária difusa moderada.	-	-	-	Inespecífico.
P285	103 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Sim	Traqueíte linfoplasmocitária multifocal a coalescente moderada.	-	-	-	Inespecífico.

Número da ave	Idade	Macroscopia	Vacinação para VLT	Diagnóstico histopatológico	PCR GaHV-1	PCR MG	PCR MS	Conclusão
P286	103 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Sim	Traqueíte linfoplasmocitária difusa discreta com perda de cílios e achatamento do epitélio multifocais associado a formação linofolicular moderada.	-	+	-	Micoplasmose
P287	20 semanas	Presença de exsudado caseoso moderado	Sim	Traqueíte fibrino hemorrágica linfoplasmocitária e heterofílica difusa intensa com células sinciciais e corpúsculos de inclusão intranucleares eosinofílicos.	-	NR	NR	Laringotraqueite infecciosa
P288	20 semanas	Presença de exsudado caseoso moderado	Sim	Traqueíte fibrino hemorrágica linfoplasmocitária e heterofílica difusa intensa com células sinciciais e corpúsculos de inclusão intranucleares eosinofílicos.	NR	NR	NR	Laringotraqueite infecciosa
P289	20 semanas	Presença de exsudado caseoso obstruindo porção inicial da traqueia	Sim	Traqueíte fibrino hemorrágica linfoplasmocitária e heterofílica difusa intensa com células sinciciais e corpúsculos de inclusão intranucleares eosinofílicos.	NR	NR	NR	Laringotraqueite infecciosa
P290	20 semanas	Presença de exsudado caseoso na traqueia	Sim	Traqueíte fibrino hemorrágica linfoplasmocitária e heterofílica difusa intensa com células sinciciais e corpúsculos de inclusão intranucleares eosinofílicos.	+	NR	NR	Laringotraqueite infecciosa
P291	20 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Sim	Traqueíte fibrino hemorrágica linfoplasmocitária e heterofílica difusa intensa com células sinciciais e corpúsculos de inclusão intranucleares eosinofílicos.	+	NR	NR	Laringotraqueite infecciosa
P292	20 semanas	Ausência de lesões macroscópicas	Sim	Traqueíte fibrino hemorrágica linfoplasmocitária e heterofílica difusa intensa com células sinciciais e	NR	NR	NR	Laringotraqueite infecciosa

corpúsculos de inclusão intranucleares  
eosinofílicos.

**ANEXO 3 - Certificado do comitê de ética em experimentação animal.**



**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)

(Mod Cert. v1 0)