Camila Peloso Bello

Detecção molecular e diagnóstico diferencial de vírus
entéricos em aves comerciais

São Paulo
2010

CAMILA PELOSO BELLO

Detecção molecular e diagnóstico diferencial de vírus entéricos
em aves comerciais

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Patologia
Experimental e Comparada da
Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Departamento:

Patologia

Área de concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientador:

Prof. Dr. Antonio José Piantino Ferreira

São Paulo
2010

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

BIBLIOTECA VIRGINIE BUFF D'ÁPICE
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
E ZOOTECNIA DA USP
21/12/10

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2404
FMVZ

Bello, Camila Peloso

Detecção molecular e diagnóstico diferencial de vírus entéricos em aves
comerciais / Camila Peloso Bello. -- 2010.
60 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo,
2011.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.
Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Prof. Dr. Antonio José Piantino Ferreira.

1. Avicultura. 2. Galinhas. 3. Vírus Entéricos. 4. Diagnóstico. 5. PCR.
I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Detecção molecular por PCR e diagnóstico diferencial de vírus entéricos em aves comerciais", protocolado sob o nº1730/2009, utilizando 200 (duzentas) galinhas, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Antonio José Piantino Ferreira, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 09/09/09.

We certify that the Research "Molecular detection by PCR and differential diagnosis of enteric virus in commercial chickens", protocol number 1730/2009, utilizing 200 (two hundred) chickens, under the Prof. Dr. Antonio José Piantino Ferreira, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 09/09/09.

São Paulo, 11 de setembro de 2009

Profa Dra Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: BELLO, Camila Peloso

Título: Detecção molecular e diagnóstico diferencial de vírus entéricos em aves comerciais.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Marli e Marcio pelo apoio, compreensão, ensinamentos, amizade e principalmente pelo amor incondicional. Sem a colaboração de vocês não seria possível chegar até aqui. Obrigada por estarem ao meu lado em todos os momentos, vocês são a razão da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Aos meus irmãos Maíra e Renato pelo e amor companheirismo.

À toda minha família (avós, tias, tios, primos e primas) pelo apoio em todos os momentos.

Ao Igor, meu menininho forte e corajoso, por me mostrar que não devemos nos entregar nos momentos difíceis da vida.

Ao meu orientador Prof. Dr. Antonio José Piantino Ferreira, pela oportunidade, pelos ensinamentos oferecidos, pela compreensão e paciência.

À Dr. Erika Spackman pela colaboração.

À Joelma e Luciana pela grande amizade.

À Liliana, uma pessoa maravilhosa, cujo apoio, tanto pessoal como profissional, foi essencial desde o início das minhas atividades no LABOR.

Ao Jorge por todos ensinamentos e pela amizade.

Aos amigos do laboratório Claudete, Lidiane, Andyara, Antônio Carlos, Elena, Luciana S. e Maurício, pela colaboração e convívio.

À Marta B. Guimarães pela confiança, pelas oportunidades e pela amizade

A Débora, Gabriella e Eduardo pelo apoio incondicional e por serem os melhores amigos que se pode ter.

Aos queridos Mateus, Ubirajara, Camila, Blanche, Fábio, Bruno e Verônica pelo carinho e por fazerem minha vida mais feliz.

À Renata, amiga para todos os momentos.

À UNESP pela formação

À USP pela oportunidade.

À CAPES pelo apoio financeiro.

À Deus por fazer parte da minha vida.

RESUMO

BELLO, C, P. **Detecção molecular e diagnóstico diferencial de vírus entéricos em aves comerciais.**[Molecular detection and differential diagnosis of enteric viruses from commercial chickens]. 2011. 60f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

O Brasil é o maior exportador e o terceiro maior produtor de carne de aves, atrás apenas de Estados Unidos e China. Para que o país se mantenha neste patamar e continue a crescer como produtor de frango, é fundamental que o setor avícola brasileiro priorize as questões sanitárias. Dentre as doenças que acometem as aves, um dos grupos mais importantes são aquelas que afetam o trato digestivo. As infecções intestinais em aves podem ser determinadas por bactérias, protozoários, micotoxinas e vírus. Os vírus entéricos das galinhas, incluindo Adenovírus, Astrovírus, Reovírus e Rotavírus, têm sido descritos como possíveis causadores da síndrome da má absorção (runting stunting syndrome), caracterizada principalmente por deficiência no crescimento, desenvolvimento retardado das penas e diarreia. Neste estudo foram avaliadas amostras provenientes de aves de produção de diferentes origens (frangos de corte, reprodutoras e poedeiras). O conteúdo intestinal de aves oriundas de lotes com sinais clínicos entéricos e também lotes com ausência destes sinais foi submetido ao diagnóstico diferencial por PCR para quatro agentes virais: Adenovírus, Astrovírus, Reovírus e Rotavírus. Das 162 amostras testadas, 65 amostras foram positivas (40,1%) para um ou mais vírus e 97 amostras foram negativas (59,9%), sendo 2 amostras (1,2%) positivas para Adenovírus, 50 (30,9%) amostras positivas para Astrovírus, 19 (11,7%) amostras positivas para Reovírus e 12 (7,4%) foram positivas para Rotavírus. Astrovírus, Reovírus e Rotavírus parecem desempenhar papel importante como agentes causadores de problemas entéricos em aves de produção, especialmente em frangos de corte. Entretanto, mais estudos direcionados à detecção, isolamento, inoculação experimental, possíveis interações e caracterização molecular relacionados aos vírus entéricos são fundamentais para melhor esclarecimento da participação destes como agentes causadores de doença em aves.

Palavras-chave: Avicultura. Galinhas. Vírus Entéricos. Diagnóstico. PCR.

ABSTRACT

BELLO, C. P. **Molecular detection and differential diagnosis of enteric viruses from commercial chickens.**[Detecção molecular e diagnóstico diferencial de vírus entéricos em aves comerciais]. 2011. 60 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Brazil is the largest exporter and the world's third largest poultry producer, behind USA and China. It is essential that Brazil prioritizes healthy issues in order to maintain this position and keep growing as poultry producer. Diseases that affect the digestive system of chickens are one of the most important group of diseases in poultry flocks. Enteric infections in chickens may be caused by bacteria, protozoans, mycotoxins and viruses. Enteric viruses, like adenovirus, astrovirus, reovirus e rotavírus, have been described as possible cause of Runting Stunting Syndrome (RSS) in poultry, characterized by growth problems, poor feathering and diarrhea. In this study were evaluated samples from laying hens, breeders and broilers. The intestinal content from healthy and affected flocks were tested by PCR for four enteric viruses from chickens: adenovirus, astrovirus, reovirus e rotavírus. From the 162 samples tested, 65 (40,1%) were positive for one or more viruses and 97 (59,9%) were negative. Two samples (1,2%) were positive for adenovirus, 50 (30,9%) were positive for astrovirus, 19 (11,7%) were positive for reovirus and 12 (7,4%) were positive for rotavírus. Astrovirus, reovirus and rotavírus seem to play an important role as causative agent of enterical disorders in chickens, mainly in commercial broilers. However, more studies about detection, viral growth, molecular characterization, experimental inoculation and possible interaction with other agents related to enteric viruses in chickens are necessary to elucidate the participation of these viruses as causative agent of diseases in chickens.

Keywords: Poultry. Chickens. Enteric Viruses. Diagnostic. PCR.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Sistema digestivo das galinhas.....	23
Figura 2 - Distribuição geográfica das amostras analisadas para vírus entéricos.....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Amostras recebidas e processadas para a detecção dos vírus entéricos por PCR no laboratório de ornitopatologia (FMVZ-USP)	33
Tabela 2 - Condições de amplificação do adenovírus aviário tipo I.....	37
Tabela 3 - Reagentes utilizados para a detecção de astrovírus, reovírus e rotavírus	38
Tabela 4 - Condições de amplificação do astrovírus e rotavírus	38
Tabela 5 - Condições de amplificação do reovírus.....	38
Tabela 6 - Distribuição geográfica das amostras	40
Tabela 7 - Amostras positivas para cada vírus isolado por tipo de ave....	42
Tabela 8 - Número de aves positivas com sinais clínicos ausentes ou presentes.....	45

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Relação de primers utilizados para a detecção dos vírus entéricos.....	36
---	----

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Número total de amostras e resultados de detecção.....	42
Gráfico 2 - Vírus detectados por tipo de ave	43
Gráfico 3 - Distribuição das amostras positivas nos frangos de corte de acordo com a idade.....	46

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

DNA	ácido desoxirribonucléico
RNA	ácido ribonucléico
g	grama
M	molar
μl	microlitro
ml	mililitro
μm	micrômetro
PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida
pb	pares de bases
PBS	Solução salina fosfatada
PCR	reação em cadeia pela polimerase
pH	potencial hidrogeniônico
rpm	rotações por minuto
RSS	Runting stunting syndrome
s	segundos
TE	tampão Tris-EDTA
U	unidade
X	vezes

LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcentagem
-	negativo
° C	graus Celsius
®	marca registrada

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	22
2.1	O SISTEMA DIGESTIVO DAS AVES	22
2.2	AS DOENÇAS DO SISTEMA DIGESTIVO DAS AVES	24
2.3	ENTERITES DE ORIGEM VIRAL.....	25
2.3.1	ROTAVÍRUS.....	26
2.3.2	ADENOVÍRUS	27
2.3.3	ASTROVÍRUS.....	28
2.3.4	REOVÍRUS.....	29
2.4	REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) NO DIAGNÓSTICO DOS VÍRUS ENTÉRICOS.....	30
3	OBJETIVOS	32
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
4.1	AMOSTRAS	33
4.1.1	AMOSTRAS DE CAMPO	33
4.1.2	AMOSTRAS DE REFERÊNCIA	34
4.3	EXTRAÇÃO DO ÁCIDO NUCLÉICO	34
4.3.1	PREPARAÇÃO DAS SUSPENSÕES	34
4.3.2	EXTRAÇÃO DE DNA.....	35
4.3.3	EXTRAÇÃO DE RNA.....	35
4.4	REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE PARA OS VÍRUS ENTÉRICOS ...	36
4.4.1	DETECÇÃO DE ADENOVÍRUS.....	36
4.4.2	DETECÇÃO DE ASTROVÍRUS, REOVÍRUS E ROTAVÍRUS.....	37
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	39
5	RESULTADOS	40
5.1	DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA	40
5.2	VÍRUS DETECTADOS POR TIPO DE AVE.....	41

5.3	VÍRUS DETECTADOS POR PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE SINAIS CLÍNICOS E TIPO DE AVE	43
5.3.1	FRANGOS DE CORTE	44
5.3.2	MATRIZES	44
5.3.3	POEDEIRAS	45
5.4	VÍRUS DETECTADOS POR IDADE DAS AVES	46
5.4.1	FRANGOS DE CORTE	46
5.4.2	MATRIZES	47
5.4.3	POEDEIRAS	47
6	DISCUSSÃO	48
7	CONCLUSÕES	52
	REFERÊNCIAS.....	53
	APÊNDICE A	60

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior exportador e o terceiro maior produtor de carne de aves, atrás apenas dos Estados Unidos e China (Relatório Anual União Brasileira de Avicultura, 2009). A importância da indústria avícola tem aumentado nos últimos anos, visto que se tornou a terceira das *commodities* exportadas pelo país, superada somente pelo minério de ferro e a soja. Neste contexto é fundamental que o setor avícola brasileiro priorize as questões sanitárias, pois manter um plantel sadio é fundamental para o país continuar a crescer como exportador de carne de frango.

Dentre as várias enfermidades que comprometem os plantéis avícolas, os distúrbios entéricos caracterizados ou não por diarreia, desidratação, perda de peso e mortalidade, juntamente com os problemas respiratórios, são os que mais contribuem para a queda no desempenho produtivo, no rendimento de carcaça e nas conseqüentes implicações econômicas (TAMEHIRO;ALFIERI; ALFIERI, 2009).

As infecções intestinais em aves podem ser determinadas por bactérias, protozoários, micotoxinas e vírus.

Os vírus entéricos das galinhas, incluindo Adenovírus, Astrovírus, Reovírus e Rotavírus, têm sido descritos como possíveis causadores da síndrome da má absorção (*runting stunting syndrome*), caracterizada principalmente por deficiência no crescimento, desenvolvimento retardado das penas e diarreia. Estes vírus foram identificados em amostras de conteúdo intestinal de lotes de aves que apresentavam os sintomas característicos (CALNEK,1978;BARNES; GUY, 2003;McFERRAN, 2003; BAXENDALE; MEBATSION, 2004; CATTOLI et al, 2005; COWEN; MITCHELL; McNULTY; REYNOLDS, 2008; PANTIN-JACKWOOD et al., 2008; SMYTH et al., 2009). Por outro lado, também já foram detectados em lotes de aves aparentemente saudáveis (REYNOLDS; SAIF; THEIL, 1987; PANTIN-JACKWOOD et al, 2008;), dificultando esta associação.

A grande maioria dos estudos envolvendo problemas entéricos na avicultura comercial mundial, e principalmente no Brasil, está relacionada a bactérias e protozoários. A etiologia viral de enterites dificilmente é incluída no diagnóstico diferencial.

Para melhor compreensão e controle das enterites virais, é necessário mais informação sobre prevalência e epidemiologia dos vírus entéricos. No Brasil, há uma grande lacuna no conhecimento sobre estes vírus associados a distúrbios entéricos em aves comerciais. O diagnóstico destes agentes infecciosos é fundamental para a elaboração de medidas sanitárias para melhoria do plantelavícola brasileiro e conseqüentemente para torná-los mais competitivos à exportação. Os estudos publicados sobre a ocorrência destes vírus entéricos em nosso país são escassos e restritos a um ou outro agente, sem o estabelecimento de um diagnóstico diferencial entre os principais vírus entéricos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O SISTEMA DIGESTIVO DAS AVES

O sistema digestivo das aves está exposto constantemente ao meio ambiente externo, portanto para atingir bons resultados produtivos é importante conhecer o funcionamento do trato gastrointestinal, especialmente das suas funções de digestão, absorção e mecanismos de defesa. A composição da ração, a seleção e qualidade dos ingredientes, assim como o manejo adequado, são peças chave para manter os parâmetros zootécnicos de acordo com os padrões estabelecidos. O funcionamento apropriado de cada um dos integrantes do sistema digestivo permite um crescimento homogêneo, resultado de uma boa digestão, absorção e um equilíbrio das barreiras naturais de defesa. A figura 1 mostra os órgãos que compõem sistema digestivo das galinhas.

Figura 1 - Sistema digestivo das galinhas

Fonte: http://www.ca.uky.edu/smallflocks/_images/internal_organ_placement.png

Inúmeros agentes infecciosos e não infecciosos podem lesar a mucosa do trato digestório, além de comprometer os processos de digestão e absorção (ITO, 2000).

A manutenção da integridade da mucosa intestinal, em condições fisiológicas normais, tem custo energético elevado, pois nas aves, e em particular nos frangos de corte, o trato gastrointestinal é o órgão que necessita de maior aporte de nutrientes e recebe entre 23% e 36% do total de energia e entre 23% e 38% de toda a proteína absorvida pelo organismo (GODDEERIS et al, 2002). Quando ocorrem lesões, as perdas não se restringem à redução da quantidade de substrato digerido e absorvido, há ainda o custo para a renovação desse epitélio. A energia conservada pela menor renovação de células no epitélio intestinal poderá ser utilizada para o desenvolvimento da massa muscular. Assim o rendimento econômico do lote estará seriamente comprometido quando existirem afecções na

mucosa do trato gastrointestinal.(MAIORKA; BOLELI; MACARI, 2002).

2.2 AS DOENÇAS DO SISTEMA DIGESTIVO DAS AVES

Dentre as doenças que acometem as aves, um dos grupos mais importantes são aquelas que afetam o trato digestivo. As doenças do trato digestivo interferem no valor do lote através da redução no ganho de peso, da utilização ineficiente do alimento, desuniformidade do lote, do aumento da susceptibilidade a outras doenças e do aumento dos custos com o tratamento (BARNES, 1997).

O alimento constitui-se em um dos maiores investimentos no lote. Desta forma, deficiências na utilização da ração são traduzidas num significativo impacto econômico para os produtores. Doenças entéricas geralmente são acompanhadas pela redução na ingestão de alimento, entretanto, algumas doenças não se manifestam através da perda do apetite, elas afetam o crescimento enquanto as aves continuam consumindo o alimento, gerando, portanto, grandes perdas para o produtor além da perda causada pela alteração nos parâmetros zootécnicos do lote.

Uma grande variedade de fatores não infecciosos (toxinas dos alimentos, estresse, manejo inadequado) e infecciosos (vírus, bactérias e parasitas) podem afetar a fisiologia do trato gastrointestinal das aves. Dentre os patógenos entéricos, as bactérias habitam em grande escala o trato gastrointestinal das aves, tais como: *E. coli*, *Salmonella* spp, *Clostridium perfringens*, *Campylobacter* sp, *Listeria monocytogenes*, *Arcobacter* sp, *Serpulina* sp e outras (PORTER, 1998; ITO, 2000). Os vírus são os mais comumente implicados na maioria das infecções com grande impacto à saúde da ave e ao desempenho do lote. Estes incluem Rotavírus, Coronavírus, Enterovírus, Adenovírus, Astrovírus e Reovírus (GUY, 1998). Dentre as doenças parasitárias que afetam o trato intestinal a coccidiose aviária é uma doença amplamente distribuída nas regiões de produção avícola e com grande impacto econômico, pois estes parasitas causam lesões graves na mucosa do intestino alterando os processos digestivos e comprometendo a absorção de nutrientes. Como resultado destas alterações e da multiplicação das *Eimerias* no tecido epitelial intestinal, as aves apresentam uma grande redução no ganho de peso, diminuição

da conversão alimentar, do consumo de ração e mortalidade em casos graves(KAWAZOWE, 1993).

O conhecimento sobre doenças do trato gastrointestinal das aves comerciais cresceu substancialmente nas últimas duas décadas. Porém, os estudos no Brasil que abordam este tema são, até o momento, insuficientes, sobretudo quando são consideradas doenças de etiologia viral. Alfieri et al (1989a), Tamehiro et al (2003) e Uiliana et al (2006) detectaram a presença de Rotavírus no conteúdo intestinal de frangos de corte no Brasil. A detecção de Reovírus (ALFIERI et al, 1989b; TAMEHIRO et al, 2003) e Adenovírus (CHACÓN, 2009) em frangos com sintomas entéricos no Brasil também já foi relatada. Ainda não foi publicado nenhum relato sobre a presença de Astrovírus em galinhas no Brasil, porém já foi detectado em perus (VILLAREAL et al, 2006; SILVA et al, 2009).

As infecções gastrointestinais causadas por vírus são responsáveis pelo desenvolvimento de grande número de doenças extra-intestinais. Os vírus podem induzir alteração da mucosa intestinal, tornando esta uma porta de entrada para outros patógenos bacterianos potenciais. Como conseqüências destas alterações na mucosa intestinal podem ocorrer deficiências nutricionais. O conhecimento dos vírus que causam doença gastrointestinal em aves comerciais, assim como o entendimento da sua patogenia e epidemiologia é necessário ao desenvolvimento de medidas profiláticas adequadas (GUY, 1998).

2.3 ENTERITES DE ORIGEM VIRAL

A maioria das infecções virais acontece nas primeiras três semanas de vida da ave, porém, algumas podem surgir mais tarde. Os sinais clínicos e as lesões induzidas pelos diferentes vírus são bastante similares, por tal motivo é difícil diagnosticar uma doença entérica e associá-la a um agente específico. Diversos vírus têm sido descritos como causadores de lesões e alterações do sistema digestivo das aves, afetando os órgãos ou a capacidade absorptiva do intestino, como Adenovírus, Astrovírus, Coronavírus, Parvovírus, Reovírus e Rotavírus(GUY, 1998;

McNULTY; REYNOLDS, 2008). Nos próximos tópicos abordaremos mais detalhadamente os vírus pesquisados neste estudo.

2.3.1 Rotavírus

As infecções pelo Rotavírus Aviário (RVA) em aves foram primeiramente relatadas por Bergeland, McAdaragh e Stotz (1977), que associaram este vírus a enterites em lotes de perus. Desde então, este vírus tem sido encontrado em diferentes espécies aviárias incluindo galinhas, faisões, periquitos, pombos, perdizes, perus, agapónis, galinhas d'angola e patos (ESTES, 1996; McNULTY; REYNOLDS, 2008). Trabalhos publicados recentemente têm mostrado alta frequência de rotavírus em plantéis avícolas nos Estados Unidos da América e na Europa (DAY; SPACKMAN; PANTIN-JACKWOOD, 2007; PANTIN-JACKWOOD; SPACKMAN; WOOLCOCK 2007; PANTIN-JACKWOOD et al., 2008). No Brasil, o primeiro relato de rotavírus aviário foi feito por Alfieri et al (1989b) que identificou o vírus em amostras de fezes de frangos de corte com diarreia. Em um trabalho realizado no Laboratório de Ornitopatologia FMVZ-USP foi detectada a presença do RVA em fezes de aves de postura e de corte apresentando diarreia e retardo de crescimento, bem como em aves assintomáticas, pela técnica de PAGE e isolamento em cultura celular (UILIANA, 2006).

Os Rotavírus são classificados como um gênero separado na família Reoviridae, são esféricos, possuem capsídeo icosaédrico com 3 camadas protéicas e não são envelopados. Apresentam um diâmetro de 70 - 75 nm. O genoma é composto de 11 segmentos lineares RNA de dupla fita (ds) (ESTES, 1996; McNULTY; REYNOLDS, 2008).

Em condições de campo, a infecção pelo RVA pode ser assintomática ou manifestar-se através de sinais clínicos como diarreia severa, desidratação, diminuição do ganho de peso e aumento de mortalidade. Em muitos casos, os problemas entéricos podem passar despercebidos e serem tratados como decorrentes de estresse por manejo ineficiente ou infecções parasitárias e bacterianas (McNULTY et al., 1979; McNULTY et al., 1980; BELLINZONI et al., 1987; ALFIERI et al., 1989b; TAMEHIRO; ALFIERI; ALFIERI, et al, 2009).

2.3.2 Adenovírus

Os Adenovírus são vírus não envelopados, icosaédricos com um diâmetro de 70 – 90 nm. Possuem no seu genoma um DNA de dupla fita que possui de 26 a 45 Kbp e sua replicação ocorre no núcleo da célula hospedeira. (WIGAND et al., 1982; DAVISON; BENKO; HARRACH, 2003).

A família *Adenoviridae* é dividida em gêneros: *Mastadenovirus* que compreende os Adenovírus dos mamíferos; *Siadenovirus* (antes denominado Adenovírus aviário grupo II) do qual fazem parte os vírus causadores da enterite hemorrágica dos perus, da síndrome do baço marmóreo dos faisões e da esplenomegalia das galinhas, porém não há associação direta bem estabelecida do agente a problemas entéricos em frangos (PIERSON; DOMERMUTH, 1997); *Atadenovirus* (antes denominado Adenovírus aviário grupo III), inclui o vírus da síndrome da queda de postura, que apesar de não possuir replicação intestinal é encontrado nas fezes mais provavelmente por extravasamento pelo oviduto (GUY, 1998), e *Aviadenovirus* (antes denominado Adenovírus aviário grupo I) que é comumente identificado em fezes e tecidos de aves com doenças gastrointestinais, mas sua patogenia não é muito conhecida e geralmente está associado com o vírus da anemia (CAV) e ao vírus da doença infecciosa da bursa (IBD). Esta divisão ocorreu devido a grande diferença genotípica e fenotípica destes Adenovírus (DAVISON; BENKO; HARRACH, 2003; Mc FERRAN, 2003; ALVARADO et al., 2007;).

Através do estudo do genoma dos Adenovírus podemos notar que existe uma região comum para todos os Adenovírus e outras regiões que são específicas para cada gênero. O gene hexon possui uma região conservada (não estrutural) e uma região variável (estrutural). Através da região conservada podemos fazer uma triagem, distinguindo o adenovírus dos demais vírus entéricos (McFERRAN, 2003).

Os Adenovírus aviários causam grandes perdas econômicas, pois são capazes de afetar vários órgãos, causando diminuição na conversão alimentar, queda na postura, produção de ovos de baixa qualidade e imunossupressão, levando a incidência de infecções secundárias. Devido a sua importância à avicultura, vários métodos de diagnósticos têm sido empregados para a identificação deste vírus, como: isolamento em cultura de células, teste de neutralização,

imunofluorescência indireta, dupla imunodifusão e PCR (ZHIXUNet al. 1999; PANTIN-JACKWOOD et al., 2008).

2.3.3 Astrovírus

Os Astrovírus pertencem à família *Astroviridae*, que é dividida em dois gêneros: o *Mamastrovírus*, isolado de mamíferos e o *Avastrovírus*, isolado de aves. Astrovírus são vírus pequenos, esféricos-icosaédricos e não envelopados, com diâmetro de 28 a 30 nm, sendo seu genoma composto de RNA de fita simples de 6,8 a 7,9 kb (MATSUI; GREENBERG, 2001; REYNOLDS; SCHULTS-CHERRY, 2008). O nome Astrovírus origina-se do grego “astron” que significa estrela, pois por microscopia eletrônica pode-se observar 5 a 6 pontas características projetadas de sua superfície (MADELEY; COSGROVE, 1975; REYNOLDS; SCHULTS-CHERRY, 2008). Entretanto, a visualização destas projeções está relacionada ao pH, portanto pode variar de acordo com o protocolo utilizado para o isolamento viral (MATSUI; GREENBERG, 2001; KOCI; SCHULTZ-CHERRY, 2002).

O Astrovírus foi descrito pela primeira vez por Madeley e Cosgrove (1975) como agente causador de gastroenterites em crianças. O primeiro caso confirmado de Astrovírus em aves ocorreu em 1965, e foi relatado por Asplin (1965) como agente causador de doença em patos, porém só foi identificado como astrovírus em 1984 por Gough et al (1984) (KOCI; SCHULTZ-CHERRY, 2002). Em 1980, foi identificado em intestino de perus jovens com diarreia e mortalidade utilizando-se como método diagnóstico a microscopia eletrônica (MCNULTY et al, 1980). A infecção em galinhas por Astrovírus foi descrita pela primeira vez em conteúdo retal frango sem sinais clínicos de distúrbios entéricos (YAMAGUCHI; IMADA; KAWAMURA, 1979), mas também já foi comprovada a presença do vírus em conteúdo intestinal de aves jovens em lotes com alta mortalidade (KOCI; SEAL; SCHULTZ-CHERRY, 2000). Diversos relatos de detecção dos Astrovírus em aves comerciais têm sido publicados nos últimos anos nos Estados Unidos e Europa (SCHULTZ-CHERRY, 2000; BAXENDALE; MEBATSION, 2004; CATTOLI et al., 2005; PANTIN-JACKWOOD; SPACKMAN; WOOLCOCK, 2006; DAY; SPACKMAN;

PANTIN-JACKWOOD, 2007; PANTIN-JACKWOOD et al, 2008; KOCI; SEAL; SMYTH et al, 2009; TODD et al, 2009).

Os Astrovírus são muito estáveis às condições de meio ambiente. São ainda relativamente resistentes à inativação por desinfetantes rotineiramente utilizados na avicultura comercial. O vírion é inativado por formaldeído (0,3%), betapropiolactona (0,1%) e o metanol (90%) (REYNOLDS; SCHULTZ-CHERRY, 2008; TAMEHIRO; ALFIERI; ALFIERI, 2009).

Em muitas espécies os Astrovírus podem causar gastroenterite branda e auto-limitante, porém nas espécies aviárias, é comum a ocorrência de infecções mais graves (TAMEHIRO; ALFIERI; ALFIERI, 2009). Os sinais clínicos da doença nas galinhas surgem com maior frequência entre a primeira e terceira semana de vida e persistem por mais de 14 dias, estes incluem diarreia, emagrecimento, apatia, ingestão da cama e distúrbios de comportamento. A patogenia da diarreia associada a infecções por Astrovírus é atribuída ao efeito osmótico dos dissacarídeos não digeridos e não absorvidos que fazem com que a água migre para a luz intestinal. A eliminação do vírus ocorre por via fecal e a contaminação por via oral. Assim, aves expostas à cama contaminada ou aves infectadas podem infectar-se por Astrovírus (REYNOLDS; SAIF, 1986; THOUVENELLE et al., 1995).

2.3.4 Reovírus

O Reovírus aviário não possui envelope, apresentando o genoma de 10 segmentos lineares de RNA dupla fita com peso molecular de 18 kb, aproximadamente (ROSENBERGER, 2003). Este vírus tem sido isolado em diferentes tecidos de frangos afetados por diferentes doenças, incluindo artrite, tenosinovite, doença respiratória, doença entérica, imunossupressão e síndrome de má-absorção (ROESSLER; ROSSENBERG, 1989; STERNER et al., 1989; VAN DER HEIDE, 1996; VAN DER HEIDE, 2000). A doença associada ao Reovírus depende diretamente do estado imune da ave, idade, patotipo e da via de exposição.

As interações com outros agentes já foram documentadas e altera a natureza e a severidade da doença (ROESSLER; ROSSENBERG, 1989; VAN DER HEIDE,

1996; VAN DER HEIDE, 2000). Ficou demonstrada a transmissão vertical, embora em baixo percentual. As aves infectadas tornam-se importantes na epidemiologia do vírus. A transmissão horizontal é importante. Em problemas entéricos, este vírus foi descrito como causador de doença entérica, emplastramento cloacal e mortalidade em aves jovens (DUTTA; POMEROY, 1967). O Reovírus aviário é freqüentemente isolado de casos de doença entérica, síndrome de má-absorção e na síndrome de mortalidade e enterite das aves (HEGGEN-PEAY et al., 2002; PANTIN-JACKWOOD et al., 2008). Foi demonstrado que o Reovírus aumenta a patogenicidade de uma variedade de outros agentes infecciosos incluindo as coccídias (RUFF; ROSENBERGER, 1985), *Cryptosporidium* spp (GUY et al., 1987), *Escherichia coli* (ROSENBERGER et al., 1986).

2.4 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) NO DIAGNÓSTICO DOS VÍRUS ENTÉRICOS

Para o diagnóstico das enterites de origem viral algumas ferramentas têm sido descritas na literatura, tais como testes sorológicos, microscopia eletrônica, PAGE, isolamento viral. Porém estas técnicas apresentam limitações quanto a implementação como método diagnóstico de rotina. A microscopia eletrônica não é muito sensível e também não possibilita análise de alto fluxo de amostras (KOI; SEAL; SCHULTZ-CHERRY, 2000), o isolamento viral é uma técnica demorada, e muitas vezes permite o crescimento de vírus presentes nas fezes em detrimento de outros mais exigentes, muitos testes sorológicos e ensaios enzimáticos ainda não foram desenvolvidos especificamente para os agentes virais deste estudo.

Nas últimas décadas, houve uma evolução dos métodos de biologia molecular, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), que permitiu desvendar o genoma da maioria dos microrganismos e com isto surgiram técnicas que agilizaram o diagnóstico de diferentes agentes infecciosos. Assim, os vírus entéricos passaram a ser estudados com maior freqüência (SAIF, 2003). Os métodos moleculares para detecção apresentam algumas vantagens em relação aos métodos tradicionais, tais como detecção de múltiplos vírus a partir da mesma amostra, não requer

propagação viral, a possibilidade de testar um grande número de amostra em tempo curto e um custo relativamente baixo do exame (PANTIN-JACKWOOD et al, 2008).

3 OBJETIVOS

1. Detectar em amostras de fezes de aves comerciais com e sem diarreia, retardo de crescimento a presença de Adenovírus, Astrovírus, Reovírus e Rotavírus.
2. Detectar através da técnica de PCR em amostras enviadas por empresas avícolas em colaboração ao estudo.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 AMOSTRAS

4.1.1 Amostras de Campo

Foram utilizadas 162 amostras de conteúdo entérico obtidas de granjas comerciais (frangos, poedeiras e reprodutoras) e amostras recebidas de empresas avícolas. Para o envio de amostras por parte das empresas sugeriu-se coletar amostras de intestino de 5 aves por lote e enviá-los conservados em gelo. Foram utilizadas amostras coletadas entre os anos de 2003 e 2009, conforme mostra a tabela 1.

Tabela 1 - Amostras recebidas e processadas para a detecção dos vírus entéricos por PCR no laboratório de ornitopatologia (FMVZ-USP)

Data de envio (Ano)	Data de processamento	Número de amostras
Sem identificação	2008	3
2003	2008	12
2004	2008	16
2005	2008	29
2006	2008	5
2007	2008	14
2008	2008	2
2009	2009	81
TOTAL		162

Foram analisadas as fichas técnicas das amostras recebidas, para as seguintes características: região geográfica de origem, tipo de ave (frangos de corte, reprodutoras, poedeiras), presença ou ausência de sinais clínicos, e para frangos de corte os dados foram analisados estratificando os grupos por idade.

4.1.2 Amostras de Referência

Para realização da técnica de PCR, foram utilizados como controles positivos amostras de diferentes origens.

Adenovírus: amostra de campo diagnosticada previamente no Laboratório de Ornitopatologia FMVZ-USP como positiva para *Aviadenovirus* nos testes de PCR e também no seqüenciamento do DNA (número de acesso do GenBank FJ360748).

Astrovírus e Rotavírus: amostras de campo positivas gentilmente cedidas pela Dra. Erica Spackman do Southeast Poultry Research Laboratory, USDA, Agricultural Research Service, Athens, Georgia. Remetida ao laboratório em cartões FTA[®] (Whatman[®] Ltd., GE Healthcare, USA).

Reovírus: vacina viva atenuada de Reovírus aviário, cepa 1133, produzida em cultura de tecidos de embriões SPF, NOBILIS[®] REO 1133 (Laboratório Intervet Schering-Plough Animal Health).

4.3 EXTRAÇÃO DO ÁCIDO NUCLEÍCO

4.3.1 Preparação das Suspensões

Um “pool” de conteúdo entérico e raspado de mucosa intestinal foi diluído em 20% de solução salina fosfatada (PBS) 0,01M, pH 7,2 (Apêndice A) e centrifugado a 12.000g/20 min a 4°C para a obtenção do sobrenadante. Como controle negativo para o procedimento foi utilizado PBS 0,01M, pH 7,2.

4.3.2 Extração de DNA

A extração de DNA para a detecção do Adenovírus foi realizada segundo o protocolo descrito por Chomkczynski et al., (1993):

- a. Homogeneizar 200µl do sobrenadante da suspensão de cada amostra, com 600 µl de Tiocianato de Guanidina – Fenol (Merck, Alemanha)
- b. Agitar em vórtex por 15 segundos.
- c. Adicionar 100 µl de clorofórmio, seguido por agitação durante 15 segundos.
- d. Centrifugar as amostras a 12.000 x g por 5 minutos a 4°C.
- e. Transferir 500µl do sobrenadante para outro tubo contendo 600 µl de propanol.
- f. Agitar por 15 segundos, e colocar a – 20°C por duas horas.
- g. Em seguida, centrifugar a 12.000 g por 20 minutos a 4°C.
- h. Descartar o sobrenadante, e lavar o *pellet* com 500 µl de etanol 70%.
- i. Centrifugar as amostras a 12.000 g por 20 minutos a 4°C.
- j. Descartar o sobrenadante e colocar os tubos em banho seco a 37 °C por 5 minutos.
- k. Adicionar finalmente 30 µl de Tampão TRIS-EDTA (TE) (Apêndice A) e colocar as amostras a 37°C por 15 minutos. Armazenar no freezer a -80°C.

4.3.3 Extração de RNA

A extração de RNA para a detecção do astrovírus, reovírus e rotavírus foi realizada com o reagente BRAZOL (LGC Biotecnologia, Brasil) de acordo com as recomendações do fabricante, a partir de 250µl do sobrenadante da suspensão. Após o procedimento foram armazenados no freezer a -80°C.

4.4 REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE PARA OS VÍRUS ENTÉRICOS

A amplificação do material genético foi realizada de maneira individual para cada agente viral. Foi utilizado o termociclador T3 Thermocycles (Biometra®). Os *primers* (Invitrogen™) utilizados para a amplificação individual do material genético de cada agente viral estão descritos no quadro 1.

Vírus	Primers	Sequências 5` - 3`	Produto (pb)	Referências
Adenovírus	Hexon A	CAAR ² TTCAGR ² CAGACGGT	897	ALVARADO et al., 2007
	Hexon B	TAGTGATGM ⁴ CGS ⁵ GACATCAT		
Astrovírus	CAS pol 1F	GAY ¹ CAR ² CGAATGCGR ² AGR ² TTG	362	DAY et al., 2007
	CAS pol 1R	TCAGTGGAAGTGGGK ³ AR ² TCTAC		
Reovírus	S4 F13	GTGCGTGTTGGAGTTTCCCG	1120	PANTIN-JACKWOOD et al., 2008
	S4 R1133	TACGCCATCCTAGCTGGA		
Rotavírus	NSP4 F30	GTGCGGAAAGATGGAGAAC	630	DAY et al., 2007
	NSP4 R660	GTTGGGGTACCAGGGATTAA		

¹Y = pirimidina; ²R = purina; ³K = G ou T; ⁴M = A ou C; ⁵S = G ou C

Quadro 1 - Relação de primers utilizados para a detecção dos vírus entéricos

4.4.1 Detecção de Adenovírus

A detecção do Adenovírus foi realizada utilizando os primers descritos anteriormente, e que amplificam um fragmento do gene codificador hexon do Adenovírus aviário (ALVARADO et al., 2007).

PCR: 5 µL do DNA extraído foram adicionados ao *mix* de PCR contendo 1 x PCR *Buffer* (InvitrogenTM), 0.2mM de cada dNTP, 0.5 pmol/µL de cada primer (Hexon A e Hexon B - tabela 3), 3.2 mM MgCl₂ e 2.5U de Taq DNA polimerase para um volume final de 50µL. As condições de amplificação do material genético estão na tabela 2.

Tabela 2 - Condições de amplificação do adenovírus aviário tipo I

Temperatura	Tempo	Ciclos
94°C	5 min	1 ciclo(desnaturação)
94°C	1 min	
52°C	45 s	34 ciclos(Anelamento)
72°C	1min 30s	
72°C	10 min	1 ciclo Extensão final

Os produtos do PCR foram analisados em gel de agarose a 1,5 % imerso em tampão Tris-Borato-EDTA (Tris-Borato 0,045 M, EDTA 1mM) e corados com *BlueGreen*[®] (LGC Biotecnologia) para a visualização através de transiluminação do gel em luz ultravioleta.

4.4.2 Detecção de Astrovírus, Reovírus e Rotavírus

Para a detecção dos agentes virais cujo material genético é constituído por RNA foi utilizado o kit QIAGEN[®] RT-PCR OneStep (QIAGEN) (DAY; SPACKMAN; PANTIN-JACKWOOD, 2007; PANTIN-JACKWOOD et al., 2008). Os reagentes utilizados e as condições de amplificação estão descritos nas tabelas 3, 4 e 5.

Tabela 3 - Reagentes utilizados para a detecção de astrovírus, reovírus e rotavírus

Reagente	Volume
Água ultrapura livre de RNase	23,0 µl
Tampão OneStep 5X*	10,0 µl
dNTP mix OneStep* (contendo 10mM de cada dNTP)	2,0 µl
Primer senso específico	4,0 µl
Primer anti-senso específico	4,0 µl
Mix Enzimas OneStep*	2,0 µl
RNA (extraído)	5,0 µl
Volume final	50 µl

* reagentes que compõem o kit RT-PCR OneStep QIAGEN.

Tabela 4 - Condições de amplificação do astrovírus e rotavírus

Temperatura	Tempo	Ciclos
50°C	30 min	1 ciclo (Transcrição reversa)
94°C	15 min	1 ciclo (desnaturação)
94°C	1 min	
55°C	30 min	35 ciclos (anelamento)
72°C	1 min	
72°C	10 min	1 ciclo (Extensão final)

Tabela 5 - Condições de amplificação do reovírus

Temperatura	Tempo	Ciclos
50°C	30 min	1 ciclo (Transcrição reversa)
94°C	15 min	1 ciclo (desnaturação)
94°C	1 min	
56°C	30 min	35 ciclos (Anelamento)
72°C	1 min	
72°C	10 min	1 ciclo (Extensão final)

Os produtos do PCR foram analisados em gel de agarose a 1,5 % imerso em tampão Tris-Borato-EDTA (Tris-Borato 0,045 M, EDTA 1mM) e corados com *BlueGreen®* (LGC Biotecnologia) para a visualização através de transiluminação do gel em luz ultravioleta.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram tabulados em tabelas e mostrados em histogramas de frequências. Para a análise de detecção dos vírus, os dados foram agrupados em tabelas e histogramas de frequência utilizando as variáveis como, tipo de aves, vírus, e presença ou ausência de sinais clínicas (CRESPO, 2002). A avaliação estatística foi realizada utilizando o programa Minitab 16.

5 RESULTADOS

5.1 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA

A Tabela 6 mostra que as amostras recebidas pertenceram às cinco regiões do Brasil, com uma diferença significativa ($p < 0.05$) para o número de amostras procedentes da região Sul e Sudeste, quando comparado com as outras regiões do Brasil. A Figura 2, mostra a distribuição geográfica das amostras processadas.

Tabela 6 - Distribuição geográfica das amostras

Região	Número de amostras
Sem identificação	3 ^d
Norte	1 ^d
Nordeste	1 ^d
Centro-Oeste	8 ^c
Sudeste	61 ^b
Sul	88 ^a
Total	162

^{a,d,c,d}letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos.

Figura 2 - Distribuição geográfica das amostras analisadas para vírus entéricos

Fonte: <http://gyabbo.wordpress.com/2010/08/26/censo-gyabbo-resultados-e-onde-voce-mora>
- acessado em 12/10/2010.

5.2 VÍRUS DETECTADOS POR TIPO DE AVE

Das 162 amostras analisadas, 65 amostras foram positivas (40,1%) para um ou mais vírus e 97 amostras foram negativas (59,9%). Neste estudo, foram confirmados a presença dos quatro vírus estudados, como mostra o gráfico 1, sendo 2 amostras (1,2%) positivas para Adenovírus, 50 (30,9%) amostras positivas para Astrovírus, 19 (11,7%) amostras positivas para Reovírus e 12 (7,4%) foram positivas para Rotavírus.

Gráfico 1 - Número total de amostras e resultados de detecção

Em relação ao tipo de ave, a comparação do número de amostras detectadas dos vírus estudados determinou que apesar do número reduzido de amostras de reprodutoras analisadas (30) todos os vírus foram isolados em oito amostras positivas (26,67%), nas poedeiras 4 amostras foram positivas para dois vírus (3 para Astrovírus e 1 para Rotavírus) de 15 amostras analisadas (26,67%), e nos frangos de corte 53 amostras foram positivas (46,5%) de um total de 114 amostras analisadas, como está descrito na Tabela 7 e esquematizado no Gráfico 2.

Tabela 7 - Amostras positivas para cada vírus isolado por tipo de ave

	Adenovírus	Astrovírus	Reovírus	Rotavírus
Frango de Corte	0	42	18	9
Reprodutoras	1	6	1	2
Poedeiras	0	3	0	1
Sem informação	1	0	0	0

Gráfico 2 - Vírus detectados por tipo de ave

Como mostra o histograma do Gráfico 2, a frequência de isolamento de Astrovírus foi maior em todos os tipos de aves quando comparado com Reovírus ou Rotavírus.

5.3 VÍRUS DETECTADOS POR PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE SINAIS CLÍNICOS E TIPO DE AVE

Das 162 amostras utilizadas no estudo, 156 amostras continham informações referentes à presença ou ausência de sinais clínicos de problemas entéricos (enterite, alta refugagem, desuniformidade no lote, entre outros) e 6 amostras não possuíam tais informações. Portanto, para a apresentação dos resultados em relação aos sinais clínicos, estas seis (06) amostras foram descartadas.

5.3.1 Frangos De Corte

Foram analisadas 116 amostras de frangos de corte, perfazendo 71,6% do total de amostras analisadas. Dentre estas amostras, 88 (75,9,2%) apresentaram sinais clínicos, 25 (21,5%) não apresentaram sinais clínicos e três (2,6%) não continham esses dados. Nos frangos de corte foram detectados três dos quatro vírus pesquisados, apenas o Adenovírus não foi detectado. Em 53 (45,7%) amostras de frangos de corte foram detectados um ou dois dos vírus estudados (Tabela 9). Em 42 (36,2%) foi detectado Astrovírus, em 18 (15,5%) foi detectado Reovírus e em 9 (7,7%) foi detectado Rotavírus. Foram detectados 16 casos de co-infecção nas amostras (10 amostras positivas para Astrovírus e Reovírus, 4 amostras positivas para Astrovírus e Rotavírus e 2 amostras positivas para Reovírus e Rotavírus). Não foi detectado nenhum dos vírus em 63 (54,3%) amostras.

5.3.2 Matrizes

Neste estudo, foram analisadas 30 amostras de galinhas reprodutoras, perfazendo 18,5% do total de amostras analisadas. Destas 30 amostras, em 16 (53,5%) foi constatada a presença de sinais clínicos entéricos, e em 14 (46,7%) os sinais clínicos estavam ausentes. Nas reprodutoras foram detectados os quatro vírus estudados. Todas as amostras consideradas positivas apresentavam sinais clínicos entéricos. Em oito amostras foi detectada a presença de um ou dois dos agentes virais pesquisados (Tabela 9). O Adenovírus foi detectado em uma amostra (3,3%), o Astrovírus foi detectado em seis amostras (20%), o Reovírus em uma amostra (3,3%) e o Rotavírus em duas amostras (6,7%). Em dois casos houve detecção de co-infecção por dois dos agentes pesquisados, em um deles foi detectado na mesma amostra Astrovírus e Reovírus, e em outro caso foi detectado Astrovírus e Rotavírus.

5.3.3 Poedeiras

Neste estudo, foram analisadas 15 amostras de galinhas poedeiras, perfazendo 9,3% do total de amostras. Destas 15 amostras, sete (46,7%) apresentaram sinais clínicos entéricos, seis (40%) não apresentavam sinais clínicos e duas (13,3%) não continham este tipo de informação. Nas poedeiras foram detectados apenas dois dos quatro vírus estudados. Em três amostras foi detectado o Astrovírus e em 1 amostra foi detectado Rotavírus. Não houve amostras com presença mais de um dos vírus pesquisados. Das amostras positivas, apenas uma amostra positiva para Astrovírus apresentou sinais clínicos entéricos (Tabela 8).

Tabela 8 - Número de aves positivas com sinais clínicos ausentes ou presentes

Tipo de Ave	Total Amostras positivas	Sinais Clínicos Ausentes				Sinais Clínicos Presentes			
		ADE	AST	REO	ROT	ADE	AST	REO	ROT
Frango de Corte	50	0 ^e	1 ^d	3 ^d	3 ^d	0 ^e	39 ^a	14 ^b	6 ^c
Reprodutoras	8	0 ^e	0 ^e	0 ^e	0 ^e	1 ^d	6 ^c	1 ^d	2 ^d
Poedeiras	2	0 ^e	2 ^d	0 ^e	1 ^d	0 ^e	1 ^d	0 ^e	0 ^e

a,b,c,d, e, letras diferentes indicam diferenças significativas em uma mesma fila

A tabela 8 mostra também que existem diferenças significativas ($p < 0.05$) quando os dados são analisados para presença ou ausência de sinais clínicos e positividade, existindo uma correlação positiva entre positividade e presença de sinais clínicos ($r=0,387$).

5.4 VÍRUS DETECTADOS POR IDADE DAS AVES

5.4.1 Frangos De Corte

Dentre estas amostras avaliadas, Astrovírus foi detectado com maior frequência em aves até os dez dias de idade como mostra a Gráfico 3, no entanto os Reovírus foram isolados em todas as idades com a menor frequência de isolamento em aves entre 21 e 30 dias. Considerando-se os Rotavírus, a frequência de isolamento foi similar na segunda e quarta semana, com menor frequência de isolamento na primeira e terceira semana.

Gráfico 3 - Distribuição das amostras positivas nos frangos de corte de acordo com a idade

5.4.2 Matrizes

Com exceção da amostra positiva para Adenovírus, cuja idade do lote era de 40 semanas, todas as amostras positivas detectadas eram oriundas de aves com idade inferior a 41 dias.

5.4.3 Poedeiras

Foram identificadas aves positivas a Astrovírus em aves às 5, 7 e 23 semanas, e uma amostra foi positiva às 13 semanas para Rotavírus.

6 DISCUSSÃO

A produção avícola no Brasil está distribuída geograficamente em duas principais regiões produtoras, a região Sul (Paraná e Santa Catarina e Rio Grande do Sul) e Sudeste (São Paulo e Minas Gerais). Estes estados respondem por cerca de 80% da produção nacional de carne de frango (Relatório Anual União Brasileira de Avicultura, 2009). Este comportamento mostra a importância da produção avícola no Brasil como o maior exportador mundial de carne de aves, e a distribuição geográfica da produção concentrada no Sul e Sudeste do país.

A avaliação geográfica da procedência das amostras mostrou que a maioria de amostras foram originárias das regiões Sul e Sudeste do Brasil. Esta distribuição das amostras reflete os resultados apresentados no relatório da União Brasileira de Avicultura (2009), onde foi publicado que a produção de frangos de corte está concentrada nas regiões Sul e Sudeste com 54% e 27% respectivamente, e a produção de poedeiras comerciais de 55% e 18% para as mesmas regiões. Estes resultados mostraram a importância da produção de frango de corte no Brasil, que o posiciona como o terceiro país produtor de carne de frango no mundo, atrás apenas de Estados Unidos e China.

Neste estudo foi encontrada a presença dos quatro vírus estudados, tanto em aves que apresentavam sinais clínicos de enterite, quanto em aves clinicamente saudáveis. Estes dados corroboram com estudos realizados em plantéis avícolas nos Estados Unidos e Europa (McNULTY et al., 1980; OTTO et al., 2006; PANTIN-JACKWOOD et al., 2008). A utilização de técnicas moleculares permite uma maior confiabilidade dos resultados em relação aos métodos tradicionais, pois estes podem ser confirmados e caracterizados através da análise do seqüenciamento do material genético.

A alta detecção de Astrovírus de galinhas (CAstV) dentre todos os vírus pesquisados, confirma os dados da literatura internacional sobre a presença destes vírus em granjas avícolas (PANTIN-JACKWOOD et al., 2008; SMYTH et al., 2009). Até o momento da conclusão desta dissertação, este é o primeiro trabalho que registra a presença do CAstV em criações comerciais de galinhas no Brasil.

Em relação aos sinais clínicos, os resultados demonstraram que existe uma correlação positiva entre a presença de sinais clínicos e a detecção dos vírus, da mesma maneira que foi relatado para Reovírus em perus quatro décadas atrás (SIMMONS et al., 1972), ou para Astrovírus (BAXENDALE; MEBATSION, 2004). Em contraste, Pantin-Jackwood e colaboradores (2008) relataram que as infecções por vírus entéricos em animais clinicamente saudáveis são frequentes em galinhas e perus. A diarreia causada pelos Astrovírus está, em grande parte, relacionada ao efeito osmótico causado principalmente por dissacarídeos não digeridos presentes no lúmen intestinal (REYNOLDS; SCHULTZ-CHERRY, 2008).

Nesta mesma linha de análise ainda não foi encontrado nenhum indício concreto de correlação entre presença de anticorpos e retardo no crescimento (BAXENDALE; MEBATSION, 2004; TODD et al., 2009). Embora alguns autores tenham demonstrado replicação viral e presença de sinais má absorção após inoculação experimental de CAstV, a relevância da detecção de CAstV em lotes de animais clinicamente saudáveis ainda não está esclarecida (PANTIN-JACKWOOD et al., 2008; JINDAL et al., 2009).

Os resultados deste estudo colocaram em evidência que as amostras de aves sem sinais clínicos foram muito menores em relação às amostras com sinais clínicos, indicando que os vírus quando causam doença permite, na maioria dos casos, a identificação dos sinais clínicos nas aves doentes.

Os Reovírus são vírus amplamente distribuídos na avicultura comercial, sendo que a maioria dos plantéis já teve ou terão algum contato com o vírus (ROSENBERGER, 2003). Neste estudo as amostras de fezes foram examinadas com o intuito de detectar Reovírus com tropismo por células intestinais, para tal realizamos um teste de RT-PCR direcionado ao gene S4 (PANTIN-JACKWOOD et al., 2008) responsável pela codificação da proteína σ NS (SCHNITZER, 1985). Embora necessite de mais estudos, este teste direcionado ao gene S4, aparenta ser mais eficaz na detecção das amostras variantes de Reovírus aviário em comparação aos testes direcionados aos genes S1, S3 (SPACKMAN; KAPCZYNSKI; SELLERS, 2005).

Os Rotavírus dos grupos A, D, F e G já foram descritos em plantéis de galinhas comerciais, detectados através sorologia e análise do padrão eletroforético em gel de poliácridamida (ALFIERI et al., 1989b; ELSCHNER et al., 2005; OTTO et al., 2006).

O teste utilizado para a detecção do Rotavírus aviário neste estudo foi o RT-PCR para o gene que codifica a proteína não estrutural NSP4. Este gene não é grupo específico, portanto não permite a diferenciação entre os grupos dos Rotavírus. Entretanto ainda não foi estabelecido um método confiável para a tipificação destes grupos. (PANTIN-JACKWOOD; SPACKMAN; WOOLCOCK, 2007). Os Rotavírus foram detectados tanto em amostras provenientes de lotes de aves sintomáticas quanto assintomáticas, o que provavelmente se deve ao fato de haver mais de um grupo de Rotavírus circulante nas criações comerciais, além da possível associação com outros vírus entéricos (PANTIN-JACKWOOD et al., 2008). A idade na qual ocorre o contato com o Rotavírus também é apontada como um dos fatores que influenciam na severidade da doença, pois de maneira geral galinhas e perus com até seis semanas de idade são mais propensos ao desenvolvimento da infecção. Paradoxalmente em um estudo experimental conduzido por Yason e Schat (1987) as galinhas entre 56 e 119 dias de idade e os perus com 112 dias de idade apresentaram maior susceptibilidade ao desenvolvimento da infecção em relação às aves nas primeiras semanas de vida. A ausência do desenvolvimento de resistência à infecção pelo fator idade foi demonstrada através do relato de um surto de diarreia associada ao rotavírus em poedeiras com idade entre 32 e 92 semanas (JONES; HUGHES, 1979; MCNULTY; REYNOLDS, 2008).

Os Adenovírus são considerados amplamente distribuídos na avicultura comercial (McFERRAN, 2003). A escassez de resultados positivos nas amostras testadas para este vírus é de certa forma inusitada. Em um estudo realizado por Pantin-Jackwood et al em 2008, nenhuma amostra positiva para Adenovírus foi encontrada dentre 43 amostras de lotes de frangos de corte testadas. Este resultado corrobora com o obtido neste estudo, pois nenhuma das duas amostras positivas detectadas pertencia a lotes de frangos de corte, ambas eram de poedeiras. A ausência de detecção do Adenovírus pode ter causas como, a verdadeira ausência deste vírus nos lotes testados, a presença de vírus variantes que não são detectados pelos testes em questão, afinal os primers utilizados foram sintetizados baseados em uma publicação internacional.

A distribuição das amostras de frangos de corte positiva para Astrovírus mostra que foram 54,5% detectadas em aves com até 10 dias de idade. Já para Rotavírus, a menor porcentagem de positivos (11,1%) foi justamente em frangos até 10 dias de idade. Estes resultados podem indicar um comportamento diferente entre

esses dois vírus. Há registros na literatura que Astrovírus e Rotavírus podem ser encontrados durante toda a permanência de um lote de aves, indicando que os vírus entéricos provavelmente persistem no plantel e no ambiente de criação (PANTIN-JACKWOOD; SPACKMAN; WOOLCOCK, 2007). Embora os vírus pesquisados tenham sido encontrados em diversas faixas etárias, não é possível determinar uma associação entre idade e infecção, pois a distribuição da amostragem foi aleatória.

Podemos notar que, tanto em lotes saudáveis quanto em lotes com sinais de distúrbios entéricos, foi detectada a presença de um ou mais de um dos vírus estudados. Não se pode tirar uma conclusão sobre este fato devido à escassez de informações sobre os lotes, mas interessante ressaltar que o levantamento epidemiológico apenas não é suficientemente eficaz na identificação dos agentes virais causadores de enterites nos plantéis avícolas.

7 CONCLUSÕES

- O primeiro estudo amplo realizado no Brasil envolvendo a pesquisa de vírus entéricos foi capaz de detectar a presença de todos os agentes pesquisados nas amostras testadas;
- O Astrovírus está amplamente distribuído nas principais regiões produtoras de aves do Brasil;
- A maior porcentagem de detecção de Astrovírus foi entre aves de até 10 dias de idade;
- Astrovírus, Reovírus e Rotavírus parecem desempenhar papel importante como agentes causadores de problemas entéricos em aves de produção, especialmente em frangos de corte;
- O adenovírus foi detectado em um número muito restrito de amostras, porém sua participação não pode ser desconsiderada, pois estirpes variantes não detectadas pelos primers utilizados podem estar em circulação;

REFERÊNCIAS

ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A.; RESENDE, M.; RESENDE, J. S. Detection and propagation of avian enteric reovirus in chicken. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 41, p.493-501, 1989a.

ALFIERI, A.F.; RESENDE, M.; RESENDE, J.S.; ALFIERI, A. Atypical rotavírus infections among broiler chickens in Brazil. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinaria e Zootecnia**. v. 41, p. 81-82, 1989b.

ALVARADO, I.R.; VILLEGAS, P.; EI-ATTRACHE, J.; JENSEN, E.; ROSALES, G.; PEROZO, F.; PURVIS, L.B. Genetic characterization, pathogenicity, and protection studies with Avian Adenovirus isolate associated with inclusion body hepatitis. **Avian Diseases**. v. 51, n. 1,p. 27-32, 2007.

ASPLIN, F. D. Duck Hepatitis. **Veterinary Records**, v.77, p. 487-488,1965.

BARNES, H. J.; GUY, J. S. Viral Poult enteritis-mortality syndrome. In: SAIF, Y.F. **Diseases of Poultry**. 11 th ed. Iowa State University Press, Ames, IA. p 1171-1180. 2003.

BARNES, H.J. Viral Enteric Infections. In: SAIF, Y.F. **Diseases of Poultry**. 10 th ed. Iowa State University Press, Ames, IA. p. 685-686. 1997.

BAXENDALE, W.; MEBATSION, T. The isolation and characterization of astroviruses from chickens. **Avian Pathology**, v. 33, n. 3,p.364-370, 2004.

BELLINZONI, R.;MATTION, N.; VALLEJOS, L.; La TORRE, L. SCODELLER, A. Atypical Rotavírus in chickens in Argentina. **Research in Veterinary Science**, v. 43, n. 1, p. 130-131, 1987.

BERGELAND, M.E., McADARAGH, J.P.; STOTZ, I. Rotaviral enteritis in turkey poults. **Proceedings of the 26 th West Poultry Diseases Conference**, Davis, CA, University of California, p.129-120. 1977.

CATTOLI, G.; TOFFAN, A.; BATTISTI, C.; SALVIATO, A.; TERREGINO, C.; CAPUA, I. Astroviruses found in the intestinal contents of guinea fowl suffering from enteritis. **Veterinary Record**, 156:220. 2005.

CHACÓN, J.L.; PEDROSO, A.C.; RODRIGUEZ, J.; PELOSO, C.; MOURA, J.; FERREIRA, C.; FERREIRA, A.J.P. Phylogenetic analysis of the hexon gene of avian adenovirus from commercial chickens and turkeys. In: International Congress of Veterinary Virology, 8, 2009, Hungria. **Anais...**Budapeste: European Society for Veterinary Virology, 2009. p. 189.

CHOMKCYNSKI, P. A. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and protein from the cell and tissues samples. **Biotechniques**, v. 15, p.532-537, 1993.

COWEN, B.; MITCHELL, G. B.; CALNEK, B. W. An adenovirus survey of poultry flocks during the growing and laying periods. **Avian Diseases**, v.22, n. 1, p. 115-121, 1978.

CRESPO, A. A. **Estatística fácil**. 17ed. São Paulo:Saraiva. 2002. 224 p.

DAVISON, A.J.; BENKO, M.; HARRACH, B. Genetic content and evolution of adenoviruses. **Journal of General Virology**, v.84, n.11, p. 2895-2908, 2003.

DAY, J.M.; SPACKMAN, E.; PANTIN-JACKWOOD, M. J. A multiplex RT-PCR test for the differential identification of turkey astrovirus type1, turkey astrovirus type 2, chicken astrovirus, avian nephritis virus, and avian rotavírus. **Avian Diseases**. v.51, n. 3,p.681-684, 2007.

DUTTA, S.K.; POMEROY, B.S. Isolation and characterization of an enterovirus of baby chicks having an enteric infection. I. Isolation and pathogenicity. **Avian Diseases**. v. 11, p. 1-9, 1967.

ELSCHNER, M.; HOTZEL, H.; REETZ, J.; DILLER, R.; OTTO, P. Isolation, identification and characterization of a group a rotavírus from a chicken: the inner capsid protein sequence shows only a distant phylogenetic relationship to most other avian group a rotaviruses. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 52, p. 211-213. 2005.

ESTES, M.K. Rotaviruses and their replication. In: FIELDS, B. N; KNIPE, P.M.; HOWLEY, P. M. **FieldsVirology**. 3rd ed. Philadelphia: Linpcoot - Raven Publishers, 1996. p. 1625-1655.

GODDEERIS, B. M.; BOERSMA, W. J. A.; COX, E.; VAN DER STEDE, Y.; KOENEN, M. E.; VANCAENEGHEM, S.; MAST, J.; VAN DER BROECK, W. The porcine and avian intestinal immune system and its nutritional modulation. In: BLOCK, M.C.; VAHL, H.A.; LANGE, L.; VAN DE BRAAK, A.E.; HEMKE, G.; HESSING, M. **Nutrition and health of the gastrointestinal tract**. Netherlands: Wageningen, 2002. p. 97-134.

GOUGH, R. E.; COLLINS, M. S.; BORLAND, E.; KEYMER, L. F. Astrovirus-like particles associated with hepatitis in ducklings. **Veterinary Record**, v.114, n. 11, p. 279. 1984.

GUY, J.S.; LEVY, M.G.; LEY, D.H. BARNES, H.J GERIG, T.M. Experimental reproduction of enteritis in bobwhite quail (*colinus virginianus*) with *Cryptosporidium* and reovirus. **Avian Diseases**, v.31, n. 4, p.713-722, 1987.

GUY, J.S. Virus infections of the gastrointestinal tract of poultry. In: **Poultry Science**, v.77, n. 8, p 1166- 1175, 1998.

HEGGEN-PEAY, C.L.; QURESHI, M.A.; EDENS, F.W.; SHERRY, B.; WAKENELL, P.S.; O'CONNELL, P.H.; SCHAT, K.A. Isolation of a reovirus from poult enteritis and mortality syndrome and its pathogenicity in turkey poults. **Avian Diseases**, v.46, n.1, p. 32-47, 2002.

ITO, N. M. K. **Morfofisiologia do intestino**. São Paulo: Elanco, 2000.

JINDAL, N., PATNAYAK, D.P., ZIEGLER, A.F., LAGO, A., GOYAL, S.M. Experimental reproduction of poult enteritis syndrome: Clinical findings, growth response, and microbiology. **Poultry Science**, v.88, p. 949-58. 2009.

JONES, R. C.; HUGHES, C. S. Rotavirus infection in commercial laying hens. **Veterinary Record**, v. 104, n.1, p.22, 1979.

KOCI, M. D.; SCHULTZ-CHERRY, S. Avian Astroviruses. **Avian Pathology**, v. 31, n. 3, p. 213-227, 2002.

KOCI, M.D.; SEAL, B. S.; SCHULTZ-CHERRY, S. Detection of turkey astrovirus by RT-PCR. **Journal of Virological Methods**, v.90, n. 1, p.79-83, 2000.

MADELEY, C.R.; COSGROVE, B.P. Letter: 28 nm particles in faeces in infantile gastroenteritis. **Lancet**, v.2, n. 7932, p. 451-452. 1975.

MAIORKA, A.; BOLELI, I.A.; MACARI, M. Desenvolvimento e Reparo da Mucosa Intestinal. In: MACARI, M.; FURLAN, R.L.; GONZALES, E. **Fisiologia Aviária Aplicada a Frangos de Corte**. 2 ed. Jaboticabal: FACTA. 2002.

MATSUI, S. M.; GREENBERG, H.B. Astroviruses. In: KNIPE, D. M.P.M. HOWLEY, P. M. **Fields Virology** 4th ed, v. 1, Baltimore, MD: Lippincott Williams & Wilkins. 2001.p. 875–893.

McFERRAN, J.B. Adenovirus Infections. In: **Diseases of Poultry**. 10th edition. Iowa State University Press, Ames, IA. p. 213-251. 2003.

McNULTY, M.S.; ALLAN, G.M.; TODD, D.; McFERRAN, J.B. Isolation and cell culture propagation of rotaviruses from turkeys and chickens. **Archives of Virology** v.61, p.13-21.1979.

McNULTY, M.S.; ALLAN, G.M.; TODD, D.; McFERRAN, J.B.; McKILLOP, E.R.; COLLINS, D.S.; McCracken, R.M. Isolation of rotaviruses from turkeys and chickens: Demonstration of distinct serotypes and RNA electropherotypes. **Avian Pathology**. v.9, p. 363-375. 1980.

McNULTY, M. S.; REYNOLDS, D. L. Rotavirus Infections. In: **Diseases of Poultry**. 12th ed. Iowa State University Press, Ames IA. p. 338-348. 2008.

OTTO, P.; LIEBLER-TENORIO, E.M; ELSCHNER, M.; REETZ, J.; LOHREN, U.; DILLER, R. Detection of rotaviruses and intestinal lesions in broiler chicks from flocks with runting and stunting syndrome (RSS). **Avian Diseases**. v.50, p. 411-418, 2006.

PANTIN-JACKWOOD, M.J.; DAY, J.M; JACKWOOD, M.W; SPACKMAN, E. Enteric viruses detected by molecular methods in commercial chicken and turkey flocks in the United States between 2005 and 2006. **Avian Diseases**. v.52, p.235-244. 2008.

PANTIN-JACKWOOD, M.J.; SPACKMAN, S; WOOLCOCK, P.R. Molecular characterization and typing of chicken and turkey astroviruses circulating in the United States: implications for diagnostics. **Avian Diseases**. v.50, p. 397-404. 2006.

PANTIN-JACKWOOD, M.J.; SPACKMAN, S.; WOOLCOCK, P.R. Periodic monitoring of commercial turkeys for enteric viruses indicates continuous presence of astrovirus and rotavirus on the farms. **Avian Diseases**, v. 51, n. 3, p. 674-680, 2007.

PIERSON, F.W.; DOMERMUTH, C.H. Avian adenoviruses. In: CALNEK, B. W.; BARNES, H. J.; BEARD, C. W.; McDOUGALD, L. R.; SAIF, Y. M. **Diseases of Poultry**. 10th ed. Ames, IA: Iowa State University Press, 1997. p. 624-633.

PORTER, R.E. Bacterial enteritides of poultry. In: **Poultry Science**. v. 77; n.8; p. 1159-1165. 1998.

REYNOLDS, D.L.; SAIF, Y.M. Astrovirus: A cause of an enteric disease in turkey poults. **Avian Diseases**, v.30, p. 728- 735, 1986.

REYNOLDS, D.L.; SAIF, Y.M.; THEIL, K. W. A survey of enteric viruses of turkey poults. **Avian Diseases**, v.31, p. 89-98. 1987.

REYNOLDS, D.L.; SCHULTZ-CHERRY, S. L. Astrovirus Infections. In: **Diseases of Poultry**. 12 th ed. Iowa State University Press, Ames IA. p. 351-354. 2008.
ROESSLER, D.E., ROSENBERGER, J.K. In vitro and in vivo characterization of avian reoviruses. III. Host factors affecting virulence and persistence. **Avian Diseases** v.33, p. 555-565. 1989.

ROSENBERGER, J. K. Reovirus infections. In: SAIF, Y. M; BARNES, H. J.; GLISSON, J. R.; FADLY, A. M; MCDUGLAD, L. R.; SWAYNE, D. E. **Diseases of Poultry**. 11 ed. Ames, IA: Iowa state University Press, 2003. p. 326-332.

ROSENBERGER, J.K., FRIES, P.A., CLOUD, S.S., WILSON, R.A. In vitro and in vivo characterization of Escherichia coli. II. Factors associated with pathogenicity. **Avian Diseases**, v.29, p.1094-1107.1986.

RUFF, M.D.; ROSENBERGER, J.K. Concurrent infections with reoviruses and coccidian in broilers. **Avian Diseases**, v.29, p. 465-478. 1985.

SAIF, Y.M. Viral Enteric Infections. In: _____. **Diseases of Poultry**. 11 th ed. Ames, IA: Iowa state University Press, 2003. p. 299-300.

SCHNITZER, T.J. Protein coding assignment of the S genes of the avian reovirus S1133. **Virology**, v.141, p. 167-170. 1985.

SILVA, S. E. L.; BONETTI, A. M.; PETROCELLI, A.; FERRARI, H. F.; LUVIZOTTO, M. C. R.; CARDOSO, T. C. Epidemiological aspects of astrovirus and turkey coronavirus in poults in the south eastern region of Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.40. p. 248-253. 2009.

SIMMONS, D. G.; COLWELL, W. M.; MUSE, K. E.; BREWER, C. E. Isolation and Characterization of an Enteric Reovirus Causing High Mortality in Turkey Poults. **Avian Diseases**, v.16 n. 4, p. 1094-1102, 1972.

SMYTH, V. J.; JEWHRST, H. L.; ADAIR, B. M.; TODD, D. Detection of chicken astrovirus by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. **Avian Pathology**, v.38, p. 293-299, 2009.

SPACKMAN, E.; KAPCZYNSKI, D.; SELLERS. Multiplex real-time reverse transcription-polymerase chain reaction for the detection of three viruses associated with poult enteritis complex: turkey astrovirus, turkey coronavirus and turkey reovirus. **Avian Diseases**. v. 49, p. 86-91. 2005.

STERNER, F.J., ROSENBERGER, J.K., MARGOLIN, A., RUFF, M.D.. In vitro and in vivo characterization of avian reoviruses. II Clinical evaluation of chickens infected with two avian reovirus pathotypes. **Avian Diseases**. v.22, p.545-554. 1989.

TAMEHIRO, C. Y.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. Infecções Entéricas de Origem Viral. In: REVOLLEDO, L.; FERREIRA, A. J. P. **Patologia Aviária**. 1 ed. Barueri, SP: Manole, 2009. p. 245-257.

TAMEHIRO, C. Y.; ALFIERI A. F.; MEDICI K. C.; ALFIERI, A. A. Segmented double-stranded genomic RNA viruses in fecal samples from broiler chicken. **Brazilian Journal of Microbiology**. V 34, p. 344-348. 2003.

THOUVENELLE, M.L.; HAYNES, J.S.; SELL, J.L.; REYNOLDS, D.L. Astrovirus infections in hatchling turkeys: Alterations in intestinal maltase activity. **Avian Diseases**. v.39, p.343-348. 1995.

TODD, D.; WILKINSON, D. S.; JEWHRST, H. L.; WYLIE, M.; GORDON, A. W.; ADAIR, B. M. A seroprevalence investigation of chicken astrovirus infection. **Avian Pathology**. v. 38, p. 301-309. 2009.

Relatório Anual da União Brasileira de Avicultura 2009. Disponível em:<www.abef.org.br>. Acesso em: 14 out. 2010.

UILIANA, G.; VILLAREAL, L.Y.B.; VALENZUELA, C.; BRANDÃO, P.E.; JEREZ, J.A.; FERREIRA, A.J.P. Detecção e isolamento de rotavírus aviário em células MA-104 de aves com e sem diarreia. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2006, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Facta, 2006. p.216.

VAN DER HEIDE, L. Introduction on avian reovirus. **Proceedings International Symposium on Adenovirus and Reovirus Infections in Poultry**, Rauschholzhausen. Germany. p.138-142. 1996.

VAN DER HEIDE, L. The history of avian Reovirus. **Avian Diseases** v.44, p. 638-641. 2000.

VILLAREAL, L. Y. B.; ASSAYAG, M. S.; BRANDÃO, P. E.; CHACÓN, J. L. V.; BUNGER, A. N. D.; ASTOLFI-FERREIRA, C. S.; GOMES, C. R.; JONES, R. C.; FERREIRA, A. J. P. Identification of turkey astrovirus and turkey coronavirus in an outbreak of poult enteritis and mortality syndrome. **Brazilian Journal of Poultry Science**. v.8, p. 131-135. 2006.

WIGAND, R.; BARTHA, R.S.; CREIZIN, R.S.; ESCHE, H.; GINSBERG, H.S., GREEN, M.; HIERHOLZER, J.C.; KALTER, S.S.; McFERRAN, J.B.; PETTERSSON, U.; RUSSELL, W.C.; WADELL, G. Adenoviridae: Second Report. **Intervirology**, v. 18, p. 169-176, 1982.

YAMAGUCHI, S.; IMADA, T.; KAWAMURA, H. Characterization of a picornavirus isolated from broiler chicks. **Avian Diseases**, v.23, p.571–581. 1979.

YASON, C. V.; SCHAT, K. A. Pathogenesis of rotavirus infection in various age groups of chickens and turkeys: clinical signs and virology. **American Journal of Veterinary Research**, v. 48, n. 6, p. 977-83. 1987.

ZHIXUN, X.; FADL, A. A.; GIRSHICK, T.; KHAN, M. T. Detection of avian adenovirus by PCR. **Avian Diseases**, v. 43, p. 98-105, 1999.

APÊNDICE A

Preparação da Solução Salina Fostatada (PBS)

Reagentes	Quantidades
Fosfato bipotássico (K_2HPO_4)	0,165 g
Dihidrogenofosfato de monopotássio (KH_2PO_4)	0,8445 g
Cloreto de sódio	8,7664 g
Água ultra-pura	1000 ml

Homogeneizar todos os reagentes até que os sais estejam completamente dissolvidos. Armazenar a 25°C.

Preparação do Tampão Tris HCl – EDTA pH 8,0 (TE)

Reagentes	Quantidades
EDTA 0,5 M	0,4 ml
Tris HCl 1 M	2 ml
Água ultra pura	197,6 ml

Homogeneizar todos os reagentes e armazenar a solução sob refrigeração a 8°C.