LUIS FABIAN NÚÑEZ NARANJO

**Isolamento e propagação de Astrovírus, Adenovírus,
Coronavírus, Parvovírus, Rotavírus e Reovírus de aves
comerciais com problemas entéricos em ovos
embrionados**

São Paulo
2011

LUIS FABIAN NÚÑEZ NARANJO

**Isolamento e propagação de Astrovírus, Adenovírus,
Coronavírus, Parvovírus, Rotavírus e Reovírus de aves
comerciais com problemas entéricos em ovos embrionados**

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

Área de Concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientador:

Prof. Dr. Antonio José Piantino Ferreira

São Paulo

2011

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2527
FMVZ

Núñez Naranjo, Luis Fabian

Isolamento e propagação de Astrovírus, Adenovírus, Coronavírus, Parvovírus, Rotavírus e Reovírus de aves comerciais com problemas entéricos em ovos embrionados / Luis Fabian Núñez Naranjo.-- 2011.

146 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2012.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Prof. Dr. Antonio José Piantino Ferreira.

1. Isolamento. 2. Vírus entéricos. 3. Ovos embrionados. 4. PCR. 5. RT-PCR.
I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Isolamento e propagação de astrovírus, adenovírus, coronavírus, parvovírus, rotavírus e reovírus de aves comerciais com problemas entéricos em ovos embrionados", protocolado sob o nº 2437/2011, utilizando 1680 (mil seiscentos e oitenta) ovos embrionados de galinha, sob a responsabilidade do(a) Prof. Dr. Antonio José Piantino Ferreira, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 26/10/2011.

We certify that the Research "Isolation and propagation of astrovirus, adenovirus, coronavirus, parvovirus, rotavirus and reovirus from commercial flocks with enteric problems in embryonated eggs", protocol number 2437/2011, utilizing 1680 (one thousand six hundred eighty) embryonated chicken eggs, under the responsibility Prof. Dr. Antonio José Piantino Ferreira, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 10/26/2011.

São Paulo, 27 de outubro de 2011.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: NUÑEZ NARANJO, Luis Fabian

Título: Isolamento e propagação de Astrovírus, Adenovírus, Coronavírus, Parvovírus, Rotavírus e Reovírus de aves comerciais com problemas entéricos em ovos embrionados

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: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

DEDICATÓRIA

A mi mami, que siempre me dijo que tenía que ser mejor, que tenía que hacer la diferencia, que tenía que ser libre, por enseñarme todo eso y por estar siempre presente en todos los días de mi vida, esto es para usted, mi ma linda.

A mis dos hermanos Anita y David que a pesar que todos estamos en un lugar distinto siempre estamos conectados y se mantuvieron ayudándome e apoyándome, les amo mis enanos, esto es parte de ustedes también ya pronto nos vemos.

A Silvana mi pequeña, mi compañera y amiga que siempre estuvo viviendo junto a mí este sueño, gracias mi Lulu por todo.

A mi otra mama Luisa que me apoyo desde siempre, juntos dimos un paso más, gracias Luisi.

En fin todo este esfuerzo es para ustedes mis mamas Lourdes, Presentita, Luisi, Mona e Neca, gracias por todo.

A toda mi familia que desde allá estuvieron ayudándome de una u otra manera, papa Lucho, mamita Presenta, Neca, Pacho, Mona, Carlín, Lourdes, Wendy, Felipe, Benjas, MJ, Jennifer, Emily, Raquel, Luisa, Rubén, Nelly, Antonio e Camila, muchas gracias los amo.

A mi Joaquín, que desde que te conocí te llevo siempre en mi corazón

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Antonio José Piantino Ferreira pela acolhida no Laboratório, pela amizade, confiança e orientação no presente trabalho, muito obrigado Professor.

À Prof. Dra. Claudete Serrano Astolfi Ferreira, pela amizade, confiança, ajuda e sugestões no presente trabalho, muito obrigado professora.

A Liliana Revolledo pela amizade, confiança e ajuda muchas gracias Liliana, por todo.

A Joelma pela confiança, pelo ensinamento e pela amizade.

A Elena pela confiança e ajuda constante, pelos ensinamentos e principalmente pela amizade, muito obrigado.

A Silvana pela ajuda e apoio durante todo o trabalho.

Aos meus colegas e amigos de Laboratório Dennis, Matteus, Maria Eugenia, Bin, Big Lu, Little Lu, Márcia, Mauricio, Terezinha pela amizade apoio e convivência.

Meu mais profundo agradecimento à Prof. Claudete e a Liliana pela ajuda extraordinária na correção deste texto, de todo coração muito obrigado, as senhoras fizeram possível a realização deste trabalho, muito obrigado.

Ao CNPq PEC-PG e à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, pela confiança e ajuda concedida para a realização deste mestrado.

*Se as portas da percepção fossem abertas, tudo apareceria ante o homem como realmente é:
infinito*

William Blake

RESUMO

NÚÑEZ NARANJO, L. F. **Isolamento e propagação de Astrovírus, Adenovírus, Coronavírus, Parvovírus, Rotavírus e Reovírus de aves comerciais com problemas entéricos em ovos embrionados.** [Isolation and propagation of Astrovirus, Adenovirus, Coronavirus, Parvovirus, Rotavirus and Reovirus from commercial poultry with enteric problems in embryonated eggs]. 2012. 146 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Os ovos embrionados são estruturas complexas compostas pelo embrião e as membranas de suporte (corioalantóide, amniótica, gema). O desenvolvimento embrionário e suas membranas geram diversos tipos de células que são necessárias para a replicação bem sucedida de uma grande variedade de vírus. Dentre os vírus entéricos, os ovos embrionados foram usados como o principal hospedeiro para o isolamento, cultivo e propagação da grande maioria destes. O presente trabalho descreve o isolamento, cultivo e propagação em ovos embrionados livres de patógenos específicos (*SPF*), assim como a caracterização macroscópica do vírus relacionado com problemas entéricos em lotes de aves comerciais no Brasil. Amostras intestinais provenientes de galinhas ou frangos de corte sadias ou com problemas entéricos (diarreia) e que se apresentaram positivas, através da reação em cadeia pela polimerase (PCR) e da técnica da transcriptase reversa da reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR), para Astrovírus de Galinha, Parvovírus de Galinha, Vírus da Nefrite Aviária, Rotavírus Aviário, Reovírus Aviário, Vírus da Bronquite Infecciosa das Galinhas e Adenovírus Aviário Tipo 1 foram selecionadas para a realização do isolamento, cultivo e propagação em ovos embrionados *SPF*. Mortalidade e lesões macroscópicas como hemorragias, edema, nanismo, enrolamento, aspecto gelatinoso e deformações foram encontradas nos embriões, porém as membranas de suporte do ovo não apresentaram alteração. A confirmação viral nas passagens nos ovos foi realizada mediante o uso da PCR ou RT-PCR. Houve a replicação de Astrovírus de galinha, Vírus da Nefrite Aviária, Adenovírus Aviário do Tipo 1, Vírus da Bronquite Infecciosa das Galinhas, Parvovírus de Galinha e Reovírus Aviário nos ovos embrionados *SPF*, inoculados via saco da gema, aos sete dias de idade. No entanto, estes vírus também foram isolados em ovos embrionados de 14 dias de idade. A inoculação pelo saco da gema se mostrou uma ótima via para o isolamento viral. Foram isoladas duas amostras de Parvovírus de Galinha, oito amostras de Astrovírus de Galinha, sete amostras do Vírus da Bronquite das Galinhas, dezesseis amostras de Vírus da Nefrite Aviária,

onze amostras de Adenovírus Aviário do Tipo 1 e três amostras de Reovírus Aviário. Nenhuma amostra de Rotavírus Aviário foi isolada. As características macroscópicas apresentadas nos embriões foram similares em todos os vírus isolados. Várias amostras utilizadas não apresentaram lesões e foram negativas na detecção molecular, e foram consideradas amostras negativas no isolamento viral. A positividade nas provas moleculares (PCR e RT-PCR) e a presença de lesões nos embriões determinou o isolamento virale confirmou que os ovos embrionados de galinha são excelentes hospedeiros para o isolamento, cultivo, propagação e caracterização de vírus relacionados com problemas entéricos, no Brasil. As alterações encontradas no embrião sugerem a patogenicidade do vírus e o possível dano que causariam ao desenvolver a doença. Futuros trabalhos determinarão a relação existente entre os vírus isolados neste estudo e aqueles isolados em todo o mundo, estabelecendo homologia ou heterogeneidade entre eles.

Palavras-chave: Isolamento. Vírus entéricos. Ovos embrionados. PCR. RT-PCR.

ABSTRACT

NÚÑEZ NARANJO, L. F. **Isolation and propagation of Astrovirus, Adenovirus, Coronavirus, Parvovirus, Rotavirus and Reovirus from commercial poultry with enteric problems in embryonated eggs.** [Isolamento e propagação de Astrovírus, Adenovírus, Coronavírus, Parvovírus, Rotavírus e Reovírus de aves comerciais com problemas entéricos em ovos embrionados]. 2012. 146 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

The embryonated eggs are complex structures composed by embryo and support membranes (yolk sac, chorioallantoic membrane, amniotic sac). The embryo development and their membranes produced many kinds of cells that are necessary for successful replication of many viruses. Between the enteric viruses, the embryonated eggs have been used as the principal host for isolation, culture and propagation of many of these viruses. The present work describes the isolation, culture, propagation and macroscopic characterization of astrovírus, adenovirus, coronavirus, parvovirus, reovírus e rotavirus, related to enteric problems in commercial flows at Brazil in chicken embryonated eggs specific pathogens free (*SPF*). Intestinal samples from hens or chickens health or with enteric problems (diarrhea), but showed positive for chicken astrovírus, chicken parvovirus, avian nephritis vírus, avian rotavirus, avian reovirus, bronchitis infectious vírus and fowl adenovirus type 1, through PCR and RT-PCR reactions, were selected for making of isolation, culture and propagation in chicken embryonated eggs specific pathogens free (*SPF*). Mortality and macroscopic lesions presented in the embryos characterized by hemorrhages, edemas, stunting, enrollment, gelatin features and deformations, however the support membranes not presented any damaged. The viral confirmation in the eggs passages was carry out using the polymerase chain reaction and transcriptase reverse of the polymerase chain reaction. Chicken astrovírus, avian nephritis vírus, fowl adenovirus type 1, bronchitis infectious vírus, chicken parvovirus and avian reovírus grow well in chickens embryonated eggs specific pathogen free *SPF*, inoculated in the yolk sac on seven days-old, however these viruses were isolated in embryonated eggs of fourteen days-old, too. The inoculation by yolk sac resulted be a optimal route for viral isolation, getting isolate two samples of chicken parvovirus, eight samples of chicken astrovirus, seven samples of bronchitis infectious vírus, sixteen samples of avian nephritis vírus, eleven samples of fowl adenovirus type one and three samples of avian reovirus, but any samples was isolated for avian rotavirus. The macroscopic characteristics presented in the

embryos were similar in all of isolated viruses. Many samples used not present lesions and were negative in the molecular detection, considering as negative samples to viral isolation. The positivity in the molecular tests (PCR and RT-PCR) and the presence of injuries in the embryo determinate the presence of enteric vírus and that chicken astrovírus, avian nephritis vírus, fowl adenovirus type 1, bronchitis infectious vírus, chicken parvovirus and avian reovírus were isolated, confirming that the chicken embryonated eggs are excellent host for isolation, culture, propagation and characterization of vírus related with enteric problems at Brazil. The pathogenicity presented in the embryo determinate the harmful the vírus are and the possible damage that their will produce in the development of disease. Future works will establish the relation exist between the isolated vírus in this work and the other viruses around the world, and their roll in the enteric disease.

Key words: Isolation. Enteric viruses. Embryonated eggs. PCR. RT-PCR.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Número de amostras virais isoladas no grupo de ovos 1, nas seis passagens realizadas	79
Figura 2 -	Amostras RT-PCR e PCR positivas e negativas na terceira e sexta passagem do grupo de ovos 1	80
Figura 3 -	Número de amostras virais isoladas no grupo de ovos 2 nas seis passagens realizadas	84
Figura 4 -	Amostras RT-PCR e PCR positivas e negativas na terceira e sexta passagem do grupo de ovos 2	84
Figura 5 -	Número de amostras virais isoladas no grupo de ovos 3 nas três passagens realizadas	88
Figura 6 -	Amostras RT-PCR e PCR positivas e negativas na terceira e sexta passagem do grupo de ovos 3	89
Figura 7 -	Número de amostras virais isoladas no grupo de ovos 4 nas três passagens realizadas	93
Figura 8 -	Amostras RT-PCR e PCR positivas e negativas na terceira e sexta passagem do grupo de ovos 4	93
Figura 9 -	Número total de amostras virais isoladas nos ovos embrionados de galinha livres de patógenos específicos (<i>SPF</i>)	96
Figura 10 -	Amostras RT-PCR e PCR positivas detectadas nos grupos dos ovos embrionados de galinha livre de patógenos específicos (<i>SPF</i>)	97
Figura 11 -	Lesões Macroscópicas avaliadas no grupo de ovos 1	101
Figura 12 -	Lesões Macroscópicas avaliadas no grupo de ovos 2	103
Figura 13 -	Lesões Macroscópicas avaliadas no grupo de ovos 3	105
Figura 14 -	Lesões Macroscópicas avaliadas no grupo de ovos 4	107
Figura 15 -	Lesões no embrião apresentadas no isolamento do CAstV em ovos embrionados de galinha <i>SPF</i>	109
Figura 16 -	Lesões no embrião apresentadas no isolamento do ANV em ovos embrionados de galinha <i>SPF</i>	110

Figura 17-	Lesões no embrião apresentadas no isolamento do ChPV em ovos embrionados de galinha <i>SPF</i>	111
Figura 18-	Lesões no embrião apresentadas no isolamento do BIG em ovos embrionados de galinha <i>SPF</i>	112
Figura 19 -	Lesões no embrião apresentadas no isolamento do reovírus aviário em ovos embrionados de galinha <i>SPF</i>	113
Figura 20 -	Lesões no embrião apresentadas no isolamento do FAdV-1 em ovos embrionados de galinha <i>SPF</i>	114
Figura 21 -	Ausência de lesões no embrião apresentadas no controle negativo (PBS) em ovos embrionados de galinha <i>SPF</i>	115
Figura 22 -	Eletroforese do produto amplificado pela RT-PCR para CAstV	116
Figura 23 -	Eletroforese do produto amplificado pela RT-PCR para ANV	117
Figura 24 -	Eletroforese do produto amplificado pela PCR para ChPV	117
Figura 25 -	Eletroforese do produto amplificado pela PCR para FAdV-1	118
Figura 26 -	Eletroforese do produto amplificado pela <i>NESTED</i> -RT-PCR para BIG	119
Figura 27 -	Eletroforese do produto amplificado pela RT-PCR para reovírus aviário	119
Figura 28 -	Eletroforese do produto amplificado pela RT-PCR para rotavírus aviário	120

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Número de ovos que foram usados nos ensaios experimentais	60
Tabela 2 -	Origem das amostras usadas no isolamento viral do grupo de ovos 1	62
Tabela 3 -	Origem das amostras usadas no isolamento viral do grupo de ovos 2	63
Tabela 4 -	Origem das amostras usadas no isolamento viral do grupo de ovos 3 e 4	64
Tabela 5 -	Tamanho dos produtos amplificados dos genes dos vírus RNA que foram estudados e referências	71
Tabela 6 -	Tamanho dos produtos amplificados dos genes dos vírus DNA que foram estudados e referências	73
Tabela 7 -	<i>Primers</i> , sequência de nucleotídeos, produto amplificado (pb) e referências dos vírus entéricos que foram estudados e referencia do vírus usado no diagnostico diferencial	74
Tabela 8 -	Vírus presente na amostra inoculada, passagem, e o vírus detectado por RT-PCR e PCR no grupo de ovos 1	78
Tabela 9 -	Número de amostras RT-PCR e PCR positivas e negativas para cada vírus estudado, no grupo de ovos 1	79
Tabela 10 -	Vírus presente na amostra inoculada, passagem, e o vírus detectado por RT-PCR e PCR no grupo de ovos 2	82
Tabela 11 -	Número de amostras RT-PCR e PCR positivas e negativas para os vírus estudados no grupo de ovos 2	83
Tabela 12 -	Vírus presente na amostra inoculada, passagem, e o vírus detectado por RT-PCR e PCR no grupo de ovos 3	87
Tabela 13 -	Número de amostras RT-PCR e PCR positivas e negativas para cada vírus estudado no grupo de ovos 3	88
Tabela 14 -	Vírus presente na amostra inoculada, passagem, e o vírus detectado por RT-PCR e PCR no grupo de ovos 4	91
Tabela 15 -	Número de amostras RT-PCR e PCR positivas e negativas para cada vírus estudado no grupo de ovos 4	92
Tabela 16 -	Vírus isolados nos quatro grupos de ovos embrionados <i>SPF</i>	95

Tabela 17 -	Lesões macroscópicas avaliadas no grupo de ovos 1	100
Tabela 18 -	Lesões macroscópicas avaliadas no grupo de ovos 2	102
Tabela 19 -	Lesões macroscópicas avaliadas no grupo de ovos 3	104
Tabela 20 -	Lesões macroscópicas avaliadas no grupo de ovos 4	106
Tabela 21 -	Mortalidade apresentada nos embriões inoculados com sete (07) dias de idade onde foram isolados os vírus entéricos	108
Tabela 22 -	Mortalidade apresentada nos embriões inoculados com quatorze (14) dias de idade onde foram isolados os vírus entéricos	108

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1	DOENÇAS ENTÉRICAS EM GALINHAS ASSOCIADAS COM VÍRUS	22
2.1.1	Astrovírus de galinhas	23
2.1.2	Vírus da Nefrite Aviária	27
2.1.3	Parvovírus de galinhas	31
2.1.4	Adenovírus aviário	34
2.1.5	Coronavírus aviário	37
2.1.6	Rotavírus aviário	40
2.1.7	Reovírus aviário	45
2.2	ISOLAMENTO E PROPAGAÇÃO VIRAL	50
2.2.1	Cultura Celular	51
2.2.2	Ovos Embrionados de Galinha	51
2.3	METODOLOGIAS DE IDENTIFICAÇÃO VIRAL	54
2.3.1	Detecção da infectividade viral	54
2.3.2	Detecção do vírus	55
2.3.3	Detecção de antígenos virais	55
2.3.4	Detecção de ácidos nucleicos virais	56
2.3.4.1	Hibridização	56
2.3.4.2	Reação em cadeia pela polimerase (PCR) e Técnica da Transcriptase Reversa da reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR)	57
3	OBJETIVOS	58

4	MATERIAL E MÉTODOS	59
4.1	ISOLAMENTO, CULTIVO E PROPAGAÇÃO	59
4.1.1	Ovos Embrionados Livres de Patógenos Específicos (<i>SPF</i>)	59
4.1.2	Vírus	60
4.1.3	Inoculo	65
4.1.3.1	Preparo do inoculo para os grupos de ovos 1 e 2	65
4.1.3.2	Preparo do inoculo para os grupos de ovos 3 e 4	66
4.1.4	Delineamento Experimental	66
4.2	CARACTERIZAÇÃO MACROSCÓPICA	67
4.3	CONFIRMAÇÃO DO ISOLAMENTO VIRAL	68
4.3.1	Amostragem, conservação e processamento de amostras para os testes moleculares	68
4.3.2	Maceração	68
4.3.3	Suspensão Viral	69
4.3.4	Extração do RNA viral	69
4.3.5	Técnica da Transcriptase Reversa da Reação em Cadeia pela Polimerase (RT-PCR)	70
4.3.6	Extração do DNA viral	71
4.3.7	Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)	72
4.3.8	Diagnostico Diferencial	73
4.3.9	<i>Primers</i>	74
5	RESULTADOS	75
5.1	DETECÇÃO E CONFIRMAÇÃO DO ISOLAMENTO, CULTIVO E PROPAGAÇÃO EM OVOS EMBRIONADOS <i>SPF</i> DE VÍRUS RELACIONADOS COM DOENÇA ENTÉRICA EM AVES	75

5.1.1	Detecção e Confirmação do isolamento viral do Grupo de ovos 1	76
5.1.2	Detecção e Confirmação do isolamento viral no grupo de ovos 2	80
5.1.3	Detecção e Confirmação do isolamento viral no grupo de ovos 3	85
5.1.4	Detecção e Confirmação do isolamento viral no grupo de ovos 4	89
5.2	ESTRATÉGIA DE ISOLAMENTO, CULTIVO E PROPAGAÇÃO DE VÍRUS ENTÉRICOS EM OVOS EMBRIONADOS LIVRES DE PATÓGENOS ESPECÍFICOS (<i>SPF</i>)	98
5.3	CARACTERIZAÇÃO MACROSCÓPICA DAS LESÕES QUE OS VÍRUS ENTÉRICOS PRODUZEM NOS EMBRIÕES DE GALINHA	98
5.3.1	Padrões para a caracterização macroscópica de vírus entéricos	109
5.4	DETECÇÃO DO ISOLAMENTO VIRAL ATRAVÉS DE PCR E RT-PCR	116
6	DISCUSSÃO	121
7	CONCLUSÕES	132
	REFERÊNCIAS	134

1 INTRODUÇÃO

A avicultura converteu-se atualmente em uma importante atividade econômica dirigida à produção de carne, ovos e derivados. Produtos que têm uma maior demanda por ser fonte de proteína saudável e de alta qualidade, que deve ser atendida para satisfazer aos consumidores que aumentam a cada ano.

A produção avícola tem vários desafios, entre estes produzir mais toneladas de alimento de qualidade a baixos custos, e trabalhar de maneira preventiva para reduzir o aparecimento de doenças que atingem às aves e aumentam os custos de produção.

As doenças entéricas têm um importante impacto econômico devido a perdas por baixa conversão alimentar e diminuição do ganho de peso. Surto de doenças entéricas são descritas no mundo todo variando em severidade (SPACKMAN; DAY; PANTIN-JACKWOOD, 2010). As causas das doenças entéricas não têm sido bem estabelecidas por serem complexas e em muitos casos envolverem diferentes agentes microbianos. Sinais clínicos similares de doenças entéricas podem ser causados por diferentes patógenos. Entre estes patógenos podem ser citadas bactérias como *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Clostridium* sp., *Campylobacter* sp., *Enterococcus* sp., protozoários como *Eimeria* sp., e vírus como astrovírus de peru, rotavírus aviário, reovírus aviário, patógenos que são detectados em lotes de frangos e perus com sintomas de doença entérica, especialmente em aves com a presença da síndrome do nanismo e diminuição do ganho de peso ou síndrome entérica dos perus (PANTIN-JACKWOOD et al., 2007; JONES, 2008; JINDAL et al., 2009; SPACKMAN; DAY; PANTIN-JACKWOOD, 2010). Síndromes são classificadas como uma doença multifatorial que atinge aves nas primeiras semanas de vida, caracterizadas principalmente por diarreia, com intestinos pálidos ou secos, com conteúdo aquoso ou ambos, depressão e letargia (JONES, 2008; JINDAL et al., 2009).

Rotavírus aviário, astrovírus de peru, astrovírus de galinha, vírus da nefrite aviária, reovírus aviário, coronavírus de peru, vírus da bronquite infecciosa e adenovírus aviário do tipo 1 foram detectados no Brasil, em lotes de frangos de corte e perus, com presença ou ausência de sinais de doença entérica (MOURA-ALVAREZ, 2011; BELLO, 2011). Assim como, em outras

partes no mundo (PANTIN-JACKWOOD et al., 2007; PANTIN-JACKWOOD et al., 2008; SPACKMAN; DAY; PANTIN-JACKWOOD, 2010).

A falta de entendimento e conhecimento do desempenho dos vírus nas doenças entéricas colabora para que sejam desenvolvidos estudos experimentais focados à reprodução da doença ou das síndromes, a partir de amostras diagnosticadas positivas para um ou vários vírus relacionados à doença (JINDAL et al., 2009; SPACKMAN; DAY; PANTIN-JACKWOOD, 2010).

Para o diagnóstico viral vários métodos foram utilizados, como o uso de microscopia eletrônica, ensaios imunoenzimáticos (ELISA), análise histopatológica e técnicas de biologia molecular pelo uso de RT-PCR, PCR e sequenciamento de DNA (DAY; SPACKMAN; PANTIN-JACKWOOD, 2007; PANTIN-JACKWOOD et al., 2007; PANTIN-JACKWOOD et al., 2008).

O isolamento viral é fundamental para estas investigações, sendo por muito tempo os ovos embrionados de galinha um dos sistemas hospedeiros mais amplamente usados em laboratório para o isolamento, propagação e caracterização de vários vírus aviários, incluindo alguns vírus entéricos como coronavírus aviário, reovírus aviário, rotavírus aviário e astrovírus aviário (ROSENBERGER, 2003; CAVANAGH; GELB, 2008; MCNULTY; REYNOLDS, 2008; REYNOLDS; SCHULTZ-CHERRY, 2008). Os ovos embrionados foram utilizados extensivamente para a propagação destes vírus, principalmente para a pesquisa e produção de vacinas (HIERHOLZER; KILLINTON, 1996; REYNOLDS, 1998; ALI; REYNOLDS, 2000).

O desenvolvimento de técnicas moleculares como a Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR), a técnica da Transcriptase Reversa da Reação em Cadeia pela Polimerase (RT-PCR) e o sequenciamento do genoma viral está permitindo obter informações sobre estes vírus. Estas metodologias permitem a detecção molecular, a confirmação do isolamento e a caracterização molecular (PANTIN-JACKWOOD et al., 2007; ZSAK; STROTHER; KISARY, 2008; DE WIT et al., 2011).

Astrovírus, adenovírus e parvovírus foram isolados em ovos embrionados de galinha em várias partes do mundo, porém nenhum foi isolado ainda no Brasil. Motivando o desenvolvimento de pesquisa sobre o comportamento destes vírus na avicultura nacional. O presente trabalho mostra o isolamento, cultivo e propagação destes vírus em ovos embrionados

de galinha livre de patógenos específicos (*SPF*), a sua caracterização macroscópica, uma estratégia de isolamento e o uso da RT-PCR e PCR como método para a confirmação do isolamento viral.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O presente estudo mostra o isolamento de astrovírus, coronavírus, adenovírus, parvovírus, rotavírus e reovírus identificados em galinhas e frangos de corte sadios ou com presença de doença entérica, provenientes de vários estados do Brasil.

2.1 DOENÇAS ENTÉRICAS EM GALINHAS ASSOCIADAS COM VÍRUS.

Infecções virais do trato gastrointestinal ocorrem comumente em galinhas e perus. Estas infecções se manifestam em aves de todas as idades, mas ocorre predominância nas aves jovens. Estas doenças são consequência da interação de vários fatores como a idade, a condição imunológica da ave e a virulência dos vírus envolvidos. Em situações de campo, estas infecções podem se agravar pela ação de outros agentes infecciosos como bactérias e protozoários, assim como, condições de manejo, ambiente e nutrição (MONTGOMERY et al., 1997, GUY, 1998).

As infecções intestinais são conhecidas por seu impacto negativo na produção avícola e aos problemas que trazem ao animal até a sua recuperação parcial ou total. Com grande frequência a mortalidade é o fator econômico mais importante, porém perdas por diminuição do ganho de peso, ausência de uniformidade do lote e diminuição do consumo de alimento são também de importância (GUY, 1998; SPACKMAN; DAY; PANTIN-JACKWOOD, 2010).

As infecções virais trazem como consequência problemas secundários, pois os vírus entéricos destroem a mucosa intestinal e causam imunossupressão nos animais, permitem a ação de bactérias, alteram a digestão e assimilação de nutrientes, produzem diarreia e problemas de crescimento (MAONDEZ; ARIAS, 2007; ADAIR; FITZGERALD, 2008; REYNOLDS; SCHULTZ-CHERRY, 2008). Síndromes entéricas em galinhas, como a síndrome do nanismo e diminuição do ganho de peso (*RSS*), em perus, a síndrome entérica dos perus (*PES*) e a síndrome da mortalidade entérica dos perus (*PEMS*), são consideradas doenças multifatoriais que afetam principalmente aves jovens e se caracterizam pela presença de diarreia, depressão, nanismo,

baixa conversão dos lotes, intestinos pálidos com conteúdo aquoso e mortalidade. Estas síndromes foram estudadas e apresentaram uma grande quantidade de agentes virais envolvidos, porém a patogenia é pouco compreendida. Astrovírus aviário, vírus da nefrite aviária, coronavírus aviário, adenovírus aviário do tipo 1, parvovírus aviário, rotavírus aviário e reovírus aviário foram encontrados em animais com estas síndromes, mas nenhum vírus foi identificado como o agente causador da doença (GOODWIN et al., 1993; JINDAL et al., 2009; SPACKMAN; DAY; PANTIN-JACKWOOD, 2010; BANYAI et al., 2011). Além dos vírus, foram encontrados bactérias como *Salmonella* spp, *Escherichia coli* e *Enterococcus* sp., e protozoários como *Eimeria* sp. sugerindo uma possível interação entre estes agentes patogênicos no desenvolvimento da doença (GOODWIN et al., 1993; MONTGOMERY et al., 1997).

Em vários países, astrovírus de galinha, vírus da nefrite aviária, adenovírus aviário do tipo 1, vírus da bronquite infecciosa das galinhas, reovírus aviário, rotavírus aviário e parvovírus de galinha foram identificados em lotes comerciais de galinhas saudáveis ou com presença de sinais de doença entérica, mostrando que os vírus entéricos estão presentes e envolvidos nas doenças entéricas (BENAVENTE; MARTINEZ-COSTAS, 2007; DAY; SPACKMAN; PANTIN-JACKWOOD, 2007; PANTIN-JACKWOOD et al., 2007; PANTIN-JACKWOOD et al., 2008; ZSAK; STROTHER; DAY, 2009; BANYAI et al., 2010; JINDAL et al., 2010).

2.1.1 Astrovírus de Galinhas

Astrovírus de Galinha (CAstV) como outros astrovírus está relacionado com doença entérica. Astrovírus são vírus não envelopados, arredondados, pequenos, com um diâmetro típico de 25 - 30 nm, possuem um genoma de RNA de polaridade positiva, envolvido por uma cápside icosaédrica. O nome astrovírus vem da palavra grega *astrom* que significa estrela e descreve as projeções de superfície que se assemelham a uma estrela e podem ocorrer em número de cinco ou seis, que foram detectadas por coloração negativa na microscopia eletrônica, mas só 10% dos vírus na população podem apresentar esta morfologia, uma visualização que depende do preparo da amostra (KOCI; SCHULTZ-CHERRY, 2002; BAXENDALE; MEBATSION, 2004; REYNOLDS; SCHULTZ-CHERRY, 2008). A família *Astroviridae* está dividida em dois

gêneros *Mamastrovirus* (Astrovírus de mamíferos) e *Avastrovirus* (Astrovírus aviário) (PANTIN-JACKWOOD et al., 2011).

Seu genoma tem uma largura entre 6,4-7 Kb com três estruturas abertas de leitura (ORFs) e uma proteína final *poly-A*. ORF1a e ORF1b codifica uma proteína não estrutural, denominada NSP1ab de 160KDa, a cadeia polipeptídica NSP1a (103 KDa) é uma serina, ou seja, uma protease viral e NSP1b de 57 KDa é uma RNA polimerase-RNA dependente. ORF2 codifica uma proteína precursora da cápside, que é formada por três cadeias polipeptídicas. Uma grande variabilidade na sequência do genoma de astrovírus é encontrada na ORF2 (SANTOS; CARDOSO, 2005; PANTIN-JACKWOOD et al., 2011). A ORF2 produz uma lipoproteína que está presente na liberação das partículas virais maduras. Partículas de astrovírus podem ser formadas por proteínas de diferentes tamanhos, dependendo da cepa e da fonte do vírus (fezes ou tecido de cultura) e de outros fatores. O tamanho das proteínas virais identificadas em astrovírus humano é similar às proteínas encontradas em animais (MAONDEZ; ARIAS, 2007).

As partículas de astrovírus são estáveis a um pH de 3,0 e resistentes a uma ampla variedade de detergentes e solventes lipídicos, incluindo clorofórmio. Astrovírus de perus é resistente ao cloro, fenol, amônia quaternária ou produtos a base de benzalcônio; porém etanol a 90%, formaldeído e propiolactona inativa este vírus (REYNOLDS; SCHULTZ-CHERRY, 2008).

Astrovírus foi descrito pela primeira vez por Madeley e Cosgrove (1975) como causa de gastroenterites em crianças, mas este não foi realmente o primeiro caso de astrovírus em humanos. O primeiro caso foi descrito por Appleton e Higgins em 1975, mas este isolado não apresentava as características morfológicas do vírus e foi identificado como um astrovírus em um estudo retrospectivo (MAONDEZ; ARIAS, 2007; REYNOLDS; SCHULTZ-CHERRY, 2008). Na década de 60 foi descrita uma doença viral em patos, este vírus foi identificado em 1984 como um astrovírus (GOUGH et al., 1985; KOCY; SCHULTZ-CHERRY, 2002). Subsequentemente, astrovírus foram descritos em lotes de perus nos Estados Unidos, nos anos oitenta, noventa e 2000 (REYNOLDS; SCHULTZ-CHERRY, 2008).

Na avicultura, foram identificados quatro astrovírus aviários (*AAstVs*): astrovírus de peru (*TAstV-1*, *TAstV-2*), vírus da nefrite aviária (*ANV*, *G-4260*) e astrovírus de pato (*DAstV*), o genoma destes vírus foram completamente sequenciados (ZHAO et al., 2011). Astrovírus de peru

foi relacionado com o complexo entérico dos perus e com a síndrome da mortalidade entérica dos perus (SCHULTZ-CHERRY; KING; KOCI, 2001). Vírus da nefrite aviária foi relacionado com as alterações patológicas nos rins de galinhas infectadas (IMADA; YAMAGUCHI; KAWAMURA, 1979). Astrovírus de pato pode causar hepatite fatal (MAONDEZ; ARIAS, 2007). Astrovírus de galinha foi detectado em pintinhos com síndrome do nanismo e diminuição do ganho de peso (ZHAO et al., 2011).

Astrovírus de peru podem ser propagados em ovos embrionados através do saco da gema em embriões de peru de 20 dias de idade, e pela cavidade amniótica em embriões de 24 dias de idade. Os embriões inoculados apresentaram intestinos distendidos, com paredes delgadas e cheios de fluido. Alterações que podem ser observadas unicamente em embriões de ovos livres de patógenos específicos, embriões de ovos comerciais não apresentam estes sinais. Geralmente a infecção com astrovírus de perus não produz morte embrionária (REYNOLDS; SCHULTZ-CHERRY, 2008). Não existem dados sobre o isolamento viral de astrovírus de galinha em ovos embrionados *SPF*, mas existem dados de que o astrovírus de galinhas pode ser cultivado em cultura primária de fígado e em linhagem celular de carcinoma hepatocelular de galinha (LMH), produzindo marcado efeito citopático (BAXENDALE; MEBATSION, 2004; MAONDES; ARIAS, 2007; REYNOLDS; SCHULTZ-CHERRY, 2008).

Astrovírus usualmente causa gastroenterite leve na maioria das espécies, mas foram descritas doenças agudas associadas ao astrovírus em animais jovens de várias espécies, incluindo humanos, gado, ovelhas, cães, gatos, cervos, galinhas, perus e patos. No entanto, doença severa foi descrita na avicultura. De maneira similar ao astrovírus humano a doença em animais geralmente se manifesta como uma doença entérica. Em galinhas, astrovírus causa diarreia leve após a infecção (MAONDEZ; ARIAS, 2007).

Astrovírus foi isolado dos intestinos de aves afetadas com doença entérica viral. Sinais clínicos da doença se desenvolveram entre uma (1) a três (03) semanas de idade, mas tipicamente foi encontrada diarreia, diminuição do consumo de alimento e nervosismo (REYNOLDS; SCHULTZ-CHERRY, 2008). Estudos experimentais usando astrovírus demonstraram uma diminuição do ganho de peso, porém a diferença foi mais significativa em animais que foram inoculados com mais de um vírus (SPACKMAN; DAY; PANTIN-JACKWOOD, 2010). A

diarreia associada com a infecção por astrovírus foi atribuída ao efeito osmótico dos dissacarídeos e outros nutrientes não digeridos e não absorvidos que atraem água ao interior da luz intestinal, à destruição do epitélio intestinal e a alterações nos canais iônicos (MOSER; SCHULTZ-CHERRY, 2005). Astrovírus foram detectados em conteúdos intestinais de perus antes do aparecimento da doença clínica e alterações patológicas, ou seja, em aves aparentemente saudáveis (REYNOLDS; SCHULTZ-CHERRY, 2008).

Infecção por astrovírus em perus induz lesões histopatológicas em toda a extensão do intestino delgado, caracterizadas por hiperplasia leve das criptas. Ao contrário de outros vírus entéricos a infecção não induz atrofia da vilosidade intestinal. Astrovírus foram identificados no citoplasma de células epiteliais intestinais, localizadas aos lados e na base das vilosidades intestinais. A liberação dos vírus no interior da luz intestinal ocorre em consequência da degeneração do enterócito (REYNOLDS; SCHULTZ-CHERRY, 2008).

Estudos experimentais destinados a reproduzir doenças entéricas em perus, com astrovírus de peru, determinaram os seguintes sinais clínicos: diarreia, diminuição do ganho de peso e letargia, animais com sinais clínicos similares foram diagnosticados com astrovírus de galinha (SPACKMAN; DAY; PANTIN-JACKWOOD, 2010; MOURA-ALVAREZ, 2011).

Existem poucas informações com respeito à imunidade aos astrovírus e esta não é bem entendida. Astrovírus aviários replicam principalmente no intestino, fazem viremia, produzindo depressão do crescimento do timo. Estudos experimentais descreveram uma diminuição no número de linfócitos do sangue periférico, que a resposta imune inata pode ser importante no controle primário da infecção por. Durante a infecção, macrófagos são induzidos a produzir óxido nítrico (NO) que inibe a replicação viral *in vivo* e *in vitro* possuindo um importante papel no controle desta infecção. Outro mecanismo de controle viral também é induzido, o interferon tipo 1 (IFN-1), que atua inibindo a replicação viral, porém os astrovírus têm desenvolvido mecanismos que inibem o IFN-1 permitindo a disseminação viral (REYNOLDS; SCHULTZ-CHERRY, 2008).

As infecções por astrovírus em animais são consideradas espécie específica, mas foram encontrados anticorpos para astrovírus de galinha em lotes de perus, sugerindo que os astrovírus aviários poderiam apresentar infecções cruzadas (MAONDES; ARIAS, 2007).

Em relação ao diagnóstico, historicamente, a microscopia eletrônica foi o método primário para este fim, e com o transcurso do tempo foram se desenvolvendo outros métodos mais fáceis, rápidos, sensíveis e específicos. Assim, para a detecção de anticorpos induzidos por astrovírus foram utilizados os métodos imunoenzimáticos como o ELISA. No entanto, métodos de detecção molecular usando a técnica da transcriptase reversa pela reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) foram empregadas e estas eram capazes de detectar prematuramente a presença viral nos animais. A reação da transcriptase reversa pela reação em cadeia da polimerase em tempo real (*real time*) (RRT-PCR) permite determinar a presença do agente na amostra em tempo real, técnica usada geralmente em humanos, e proporciona mais sensibilidade e especificidade no diagnóstico (BAXENDALE; MEBATSION, 2004; MOSER; SCHULTZ-CHERRY, 2005; PANTIN-JACKWOOD; SPACKMAN; WOOLCOCK, 2006; DAY; SPACKMAN; PANTIN-JACKWOOD, 2007; DAÍ et al., 2010; DE WITT et al., 2011; PANTIN-JACKWOOD et al., 2011).

2.1.2 Vírus da Nefrite Aviária

Vírus da Nefrite Aviária (ANV) produz doença aguda, muito contagiosa e caracterizada por alterações renais em aves, principalmente jovens. Este vírus é classificado como um novo gênero da família *Astroviridae*. O vírus da nefrite aviária é arredondado, não envelopado, com um diâmetro de 28 nm, possui um genoma de RNA de polaridade positiva, com cápside icosaédrica (ZHAO et al., 2011).

Seu genoma consta de aproximadamente 7, 000 nucleotídeos (nt) com três estruturas abertas de leitura ORF 1a, 1b e 2. A ORF 1a codifica uma protease sérica denominada 3C, a ORF 1b codifica uma polimerase RNA - dependente do RNA viral e de uma estrutura ribossomal presente entre as duas ORFs (ORF 1a e ORF 1b). A ORF2 codifica as lipoproteínas precursoras da cápside, que têm uma homologia de aminoácidos de 26% com o astrovírus humano (IMADA et al., 2000; IMADA, 2008).

O vírus da nefrite aviária é estável a um pH de 3,0, com densidade não determinada pela sensibilidade ao cloreto de cério, com resistência a uma variedade de detergentes, solventes lipídicos, incluindo clorofórmio, cloro e fenol igual aos outros astrovírus (IMADA et al., 2000).

Imada et al. em 1976, isolaram pela primeira vez o vírus da nefrite aviária, de conteúdos retais de frangos aparentemente saudáveis, em cultura de células de rim de embrião de frango e este foi identificado como um picornavírus pelas suas propriedades físico-químicas e morfológicas. Estudos experimentais realizados com este vírus, denominado inicialmente como um picornavírus, determinaram lesões renais (nefrite e nefrose). Baseados nestes resultados presumiram que o órgão alvo para este vírus seria o rim e então propuseram o nome de Vírus da Nefrite Aviária, nome que se mantém até hoje (IMADA; YAMAGUCHI; KAWAMURA, 1979; MAEDA et al., 1979; IMADA et al., 1981; IMADA et al., 2000). Este vírus foi considerado um picornavírus até que vários estudos mostraram diferenças com outros membros da família *Picornaviridae*, classificando-o como um novo membro da família *Astroviridae*. As seguintes características diferenciaram este vírus: 1) o seu genoma consistia de 7, 000 nt com três estruturas abertas de leitura, ORF 1a, 1b e ORF 2; 2) o tratamento com tripsina não era necessário para seu crescimento em cultura celular; 3) era geneticamente distinto de outros picornavírus; 4) tinha replicação no citoplasma celular; 5) possuía um diâmetro de 28nm; 6) apresentava resistência ao etil éter, clorofórmio, tripsina e pH ácido; 7) era lábil a temperaturas altas; 8) apresentava estabilidade parcial em cloreto de magnésio a 50°C (IMADA et al., 2000; IMADA, 2008).

Vírus da nefrite aviária pode ser propagado e isolado utilizando suspensões de rins como inóculo, sendo este depositado no saco da gema de ovos embrionados *SPF* com seis (06) dias de incubação. Os embriões se apresentam hemorrágicos, edematosos e com nanismo. Em culturas primárias de rins de embrião de galinha produz efeito citopático após 72 horas da inoculação (IMADA; YAMAGUCHI; KAWAMURA, 1979; TAKASE et al., 1994; IMADA, 2008; TODD et al., 2010).

Este vírus afeta principalmente animais jovens que desenvolvem a doença clínica, apresentando lesões renais, tubulonefrose, nefrite intersticial e morte. Por outro lado, o vírus da nefrite aviária foi associado também com diarreia, retardo do crescimento, e morte principalmente de pintinhos ou aves jovens (IMADA; YAMAGUCHI; KAWAMURA, 1979;

SHIRAI et al., 1991; BIDIN et al., 2011). Frangos de diferentes idades podem ser infectados, porém pintinhos de um dia de idade são os mais susceptíveis (SHIRAI et al., 1991).

Estudos de patogenicidade determinaram que após três a seis dias da inoculação ocorria a presença de diarreia e nefrose. A morte pela deposição visceral de uratos ocorria sete (07) dias após a inoculação (SHIRAI et al., 1991). No entanto, vírus de campo podem apresentar diferentes graus de patogenicidade em frangos, sugerindo que diferentes sorotipos e cepas podem variar sua capacidade de produzir a doença e a morte (IMADA, 2008; HEWSON; OROURKE; NOORMOHAMMADI, 2010; BIDIN et al., 2011).

O único sinal clínico da doença em aves jovens é a diarreia, ocorrendo posteriormente a diminuição do ganho de peso. Em condições de campo, sinais clínicos associados com o vírus da nefrite aviária variaram desde nenhum até problemas renais como os que ocorrem na nefropatia do pintinho (*baby chick nephropathy*) ou problemas digestivos como aqueles da síndrome de nanismo e diminuição do ganho de peso (*runting and stunting*) (IMADA; YAMAGUCHI; KAWAMURA, 1979; IMADA et al., 1981; MANDOKI et al., 2006; IMADA, 2008; HEWSON; OROURKE; NOORMOHAMMADI, 2010).

A infecção pelo vírus da nefrite aviária em galinhas induz lesões histopatológicas nos rins, caracterizadas por necroses e degeneração das células epiteliais dos túbulos proximais, com infiltração de granulócitos, linfócitos e fibroses (IMADA, 2008).

Estudos experimentais em pintinhos com o vírus da nefrite aviária determinaram lesões renais (nefrite e nefrose), ocorrendo inicialmente lesões inflamatórias, linfocíticas, com degeneração granular do epitélio do túbulo renal, na área glomerular. Outros órgãos não apresentaram lesões significativas, porém o vírus foi recuperado de vários órgãos como cérebro, traqueia, jejuno, rins e reto. Dessa forma, o vírus é amplamente distribuído nos órgãos do animal, sendo que os maiores títulos virais foram encontrados nos rins e jejuno; e os menores títulos na bolsa de Fabricius, baço e fígado (IMADA; YAMAGUCHI; KAWAMURA, 1979).

Anticorpos para o vírus da nefrite aviária foram detectados em lotes de perus, frangos e galinhas poedeiras, mostrando que o vírus da nefrite aviária se encontra amplamente distribuído (IMADA; YAMAGUCHI; KAWAMURA, 1979). Estudos experimentais destinados a

determinar a susceptibilidade de embriões e pintinhos provenientes de aves imunizadas com o vírus mostraram ausência de morte embrionária e de alterações renais nos pintinhos, porém existiu replicação viral ao nível intestinal (TAKASE et al., 1994).

Em perus e galinhas este vírus foi detectado e seu genoma foi sequenciado. Foi caracterizado em pombos e patos mortos ou doentes, mostrando similaridade significativa com cepas do ANV, comprovando que o vírus está se disseminando em mais espécies de aves (BIDIN et al., 2011; SHAO et al., 2011).

O diagnóstico do vírus da nefrite aviária foi realizado através da microscopia eletrônica, da detecção de imunoglobulinas usando métodos imunoenzimáticos, e por técnicas moleculares que permitiram a obtenção de melhores resultados, aumentando a rapidez, especificidade e sensibilidade de sua detecção (IMADA; YAMAGUCHI; KAWAMURA, 1979; TAKASE et al., 1994; ZHAO et al., 2011).

O diagnóstico diferencial do ANV é importante, pois outros vírus como as cepas nefrotóxicas do vírus da bronquite infecciosa das galinhas (BIG), que causa nefrite intersticial, pode dificultar o diagnóstico do vírus da nefrite aviária, sendo necessário o uso de técnicas moleculares como a RT-PCR, que indiquem sua presença ou ausência (TODD et al., 2010).

Técnicas moleculares como RT-PCR e o sequenciamento genético estão sendo desenvolvidas e utilizadas para a detecção e o diagnóstico do vírus da nefrite aviária que está presente nas aves no mundo (MANDOKI et al., 2006; DAY; SPACKMAN; PANTIN-JACKWOOD, 2007; TODD et al., 2010; BIDIN et al., 2011; ZHAO et al., 2011), determinando a presença do vírus que está circulando nos Estados Unidos, Austrália, Japão, China, Hungria e Brasil em lotes de galinhas e perus saudáveis ou com sintomas de doença entérica (diarreia) (MANDOKI et al., 2006; DAY; SPACKMAN; PANTIN-JACKWOOD, 2007; HEWSON; OROURKE; NOORMOHAMMADI, 2010; MOURA-ALVAREZ, 2011; BELLO, 2011).

2.1.3 Parvovírus de galinhas

Parvovírus de galinhas está relacionado com doença entérica em galinhas, ocasionando principalmente retardo do crescimento, diminuição do ganho de peso e diarreia. Parvovírus são vírus pequenos, não envelopados, com uma cadeia linear simples de DNA com um genoma de 5Kb. Apresenta uma cápside não envelopada, com 20-22 nm de diâmetro e simetria icosaédrica formada de duas a quatro proteínas superpostas, designadas VP1-VP4 (HUEFFER; PARRISH, 2003; BERNIS; PARRISH, 2007).

A proteína VP2 é a maior proteína estrutural, que se encontra em alta concentração na superfície da cápside, determina várias funções, incluindo o tropismo pelo hospedeiro e pelos tecidos, o receptor de união celular e os epítomos que se ligam aos anticorpos. A sequência N-terminal desta proteína é externalizada através de um canal, isto permite que seja clivada e origine a proteína VP3. Este canal é usado também para o empacotamento do DNA, que permite a exposição de sequência terminal do genoma sobre a parte externa da cápside. Outras características da cápside em parvovírus de vertebrados incluem uma longa ou três pequenas protruções como espículas que se encontram em torno de três eixos icosaédricos simétricos, que são os sítios onde se ligam os anticorpos antivirais. A proteína VP3 se forma da clivagem da proteína VP2. As proteínas da cápside não são glicosiladas, mas muitas são variavelmente fosforiladas. A proteína VP1 da maioria dos parvovírus contém uma fosfolipase cálcio dependente, PLA₂, que tem atividade enzimática, e se encontra dentro da cápside da maioria dos vírus, porém fica exposta durante a entrada na célula. Os aminoácidos da região N-terminal da proteína VP1 funcionam como centros localizadores do núcleo celular durante a entrada do vírus na célula e no momento da formação da cápside (BERNIS; PARRISH, 2007). O genoma completo do parvovírus de galinha foi determinado em 5257 nucleotídeos e tem uma organização básica similar aos membros da família *Parvoviridae* (DAY; ZSAK, 2010). A família *Parvoviridae* contém duas subfamílias: *Parvovirinae* que infecta vertebrados e *Desovirinae* que infecta insetos e outros invertebrados (BERNIS; PARRISH, 2007).

As partículas de parvovírus têm uma densidade de 1,39 a 1,42 g/mL, estável em um pH de 3,0 a 9,0 e resistente a 56°C por uma hora. O vírus pode ser inativado por formalina, hidroxilamina e agentes oxidantes (BERNS; PARRISH, 2007).

Parvovírus de galinha foi descrito pela primeira vez por Kisary et al., em 1984, o qual sugeriu que as pequenas partículas virais de 19 a 24 nm de diâmetro, com uma densidade de 1,43 g/mL em cloreto de cério (CsCl) e simetria hexagonal, detectadas por microscopia eletrônica em amostras de intestino de frangos de 10 dias de idade, pudessem ser responsáveis pela síndrome do nanismo e diminuição do ganho de peso (RSS). Os animais apresentavam marcado retardo do crescimento, pobre empenamento e tratos intestinais muito pálidos (KISARY; NAGY; BITAY, 1984). Imunofluorescência direta demonstraram fluorescência intranuclear em enterócitos de frangos infectados experimentalmente com as partículas virais do suposto parvovírus proveniente de galinhas com problemas entéricos e retardo de crescimento, indicando que o vírus replicava no núcleo das células infectadas. Estes resultados associado às propriedades do vírus sugeriam que o vírus pertencesse à família *Parvoviridae* (KISARY, 1985). O que foi confirmado pela análise da estrutura genômica do vírus e por suas características como a sensibilidade ao tratamento com DNase e S1 nuclease, resistência as RNase, e conversão *in vitro* da cadeia dupla de aproximadamente 5,2 Kb (KISARY et al., 1985).

Parvovírus de ganso e parvovírus de pato Muscovy causaram grande mortalidade em patos e gansos, doença que foi descrita pela primeira vez em 1960, em muitos países de Europa e Ásia. Estudos determinaram que o seu genoma permaneceu estável ao longo do tempo e que não apresentavam transmissão para as aves comerciais (ZSAK; STROTHER; DAY, 2009).

Membros da família *Parvoviridae* infectam uma ampla variedade de hospedeiros, desde insetos a primatas e são bem conhecidos por causar doença entérica, principalmente em hospedeiros jovens (KISARY; NAGY; BITAY, 1984; HUEFFER; PARRISH, 2003; DAY; ZSAK, 2010).

Embriões de galinha, pintinhos *SPF* e pintinhos de corte comerciais de um dia de idade foram infectados com parvovírus isolado de frangos com atraso de crescimento. Os resultados mostraram uma diminuição do tempo de incubação dos ovos e os pintinhos que nasceram tiveram

vitalidade diminuída e enterites. Os frangos desenvolveram também enterites, retardo do crescimento e desordens nos ossos (KISARY, 1985).

A replicação do parvovírus depende de fatores celulares que são encontrados durante o período S do ciclo celular. Assim, a replicação e os efeitos patogênicos predominam em células com um alto grau de proliferação celular. A doença intestinal ocorre como resultado da infecção pelo parvovírus nas células epiteliais nas criptas de *Liberkuhns* (GUY, 1998).

Em consequência da detecção por microscopia eletrônica de partículas virais semelhantes ao parvovírus presentes em cultura celular primária de fibroblastos de embrião de galinha preparada de embriões não inoculados, e a posterior confirmação de sua densidade e morfologia, sugere que parvovírus de galinha possa apresentar transmissão transovariana ou vertical além da transmissão horizontal através das fezes (KISARY; MILLER-FAURES; ROMMELAERE, 1987).

Parvovírus aviário foi detectado no conteúdo intestinal de lotes de galinhas e perus com problemas entéricos, que incluíam principalmente diarreia, sendo associado com a síndrome de nanismo e diminuição do ganho de peso (*RSS*) e o Complexo entérico dos perus (*PEC*) (KISARY; NAGY; BITAY, 1984; KISARY; MILLER-FAURES; ROMMELAERE, 1987; STROKER; ZSAK, 2009; ZSAK; STROTHER; DAY, 2009; PALADE et al., 2011).

Recentemente, parvovírus de galinha foi relacionado com a doença neural em frangos de corte jovens, caracterizada por hipoplasia cerebelar e hidrocefalia, onde o vírus foi detectado através da PCR (MARUSAK et al., 2010).

Com respeito à resposta imune, parvovírus de galinha induz uma resposta típica, estimulando a produção de IgM, que é detectável entre 14 e 21 dias após a inoculação, esta classe de anticorpo é trocada pela IgG que é detectada em altas concentrações após 32 dias da inoculação (STROKER; ZSAK, 2009; ZSAK; STROTHER; DAY, 2009).

O diagnóstico viral de parvovírus foi realizado pelo uso da microscopia eletrônica, imunofluorescência indireta, técnicas imunoenzimáticas (ELISA) e técnicas moleculares (PCR) que aumentaram a sensibilidade e especificidade do diagnóstico (TSAI et al., 2004; ZSAK;

STROTHER; KISARY, 2008; STROTHER; ZSAK, 2009; ZSAK; STROTHER; DAY, 2009; MARUSAK et al., 2010; PALADE et al., 2011).

2.1.4 Adenovírus aviário

Adenovírus aviário do Tipo 1 em galinhas foi associado com hepatite por corpos de inclusão, síndrome do hidropericárdio, erosões da moela, ventriculite (GOODWIN, 1993), proventriculite (KOUWENHOVEN; DAVELAAR; VAN-WALSUN, 1978) enterites e síndrome de nanismo e diminuição do ganho de peso (*RSS*) (GOODWIN et al., 1993; GUY, 1998; ADAIR; FITZGERALD, 2008; WILSON et al., 2010).

O virion do adenovírus aviário não é envelopado, com estrutura icosaédrica, diâmetro entre 70-90 nm e densidade de 1,32-1,37 g/mL em CsCl. É um vírus com cadeia dupla de DNA, que corresponde a 11,3-13,5% do virion (ADAIR; FITZGERALD, 2008).

O virion é composto de 252 capsômeros. Os capsômeros estão dispostos de forma triangular, seis em cada lado. Existem 240 capsômeros que não pertencem ao vértice (hexonas) do triângulo de 8-9,5 nm de diâmetro e 12 capsômeros do vértice (bases pentônicas). Os capsômeros do vértice possuem projeções conhecidas como fibras. Adenovírus aviário apresenta duas fibras em cada base pentônica o que o diferencia do adenovírus de mamífero que contém uma só. Como a fibra interage com a proteína do receptor celular, a incorporação de duas fibras protéicas poderia aumentar os tipos celulares aos quais estes vírus poderiam se ligar (BERK, 2007).

A maior proteína da cápside é conhecida como HEXON e contém os determinantes antigênicos específicos do tipo, grupo e subgrupo viral. Estimula a produção de anticorpos específicos para tipo, grupo e subgrupo viral (ALVARADO et al., 2007). Adenovírus aviário foi caracterizado ao nível gênico através da RFLP, a qual comparou os pesos moleculares das bandas

obtidas, que são geralmente de 13,5 Kb, 9,0 Kb, 6,5 Kb, 4,0 Kb, 2,0 Kb e 1,4 Kb (EL-ATTRACHE; VILLEGAS, 2001).

A família *Adenoviridae* tem dois gêneros reconhecidos *Mastadenovirus* isolado de mamíferos, inclusive os humanos e *Aviadenovirus* isolado de aves. No entanto, existem outros gêneros pouco estudados, como *Atadenovirus* denominado assim por seu incomum conteúdo de adenina e timina que foram isolados de répteis, aves, marsupiais e mamíferos e o *Siadenovirus* isolado de um réptil e aves. (BERK, 2007). *Aviadenovirus* sorologicamente diferem de *Mastadenovirus* e também na organização do seu genoma. Este gênero contém a maioria dos adenovírus caracterizados, isolados de galinhas, perus e gansos. Adenovírus aviário do tipo 1 se encontra dentro do gênero *Aviadenovirus* (FITZGERALD, 2008).

O primeiro adenovírus foi isolado em 1949 quando amostra de doença de pele granulosa em bovinos foi inoculado em ovos embrionados de galinha. Porém, o primeiro adenovírus aviário isolado de uma ave doente era proveniente de um surto de doença respiratória em codornas (*Colinus virginianus*) (BERK, 2007; FITZGERALD, 2008).

Adenovírus aviário do tipo 1 ao ser inoculado em ovos embrionados de galinha, primeiro se replica na membrana corioalantóide (CAM), estabelecendo uma viremia primária a qual permite que o vírus alcance o fígado. Neste órgão o vírus se propaga rapidamente o que resulta em necrose ou lise celular e a consequente propagação do vírus para as células vizinhas, produzindo uma viremia secundária durante a qual ocorre a disseminação para outros órgãos susceptíveis como o intestino e rins (EL-ATTACHE; VILLEGAS, 2001; ALEMNESH et al., 2010). A maioria dos adenovírus aviários replica bem em culturas celulares primárias de rim e fígado. A replicação ocorre no núcleo celular e existe a formação de inclusões intranucleares, foram identificados quatro tipos de inclusões que se diferenciam pela densidade e a morfologia (ADAIR; FITZGERALD, 2008; FITZGERALD, 2008).

Adenovírus aviário tipo 1 relacionado com hepatite por corpos de inclusão, quando inoculados pela CAM em ovos embrionados de nove (09) dias de idade, provocaram hemorragia, edema, fígados verdes e com hepatite, espessamento da CAM, congestão dos órgãos viscerais, perda de peso, nanismo e alta mortalidade (EL-ATTACHE; VILLEGAS, 2001; GOMIS et al., 2006; ALVARADO et al., 2007; OJKIC et al., 2008; ALEMNESH et al., 2010; SENTIES-CUE

et al., 2010). A mortalidade foi maior em 8-9 dias após a inoculação e as lesões ultra-estruturais e histopatológicas foram encontradas entre 7-10 dias após a inoculação. O fígado do embrião é o melhor órgão para ser usado no isolamento e propagação do adenovírus aviário do tipo 1 (ALEMNESE et al., 2010).

Adenovírus aviário atinge o fígado e órgãos hematopoiéticos, produzindo anemia aplástica. As principais lesões encontradas eram fígados inchados, pálidos e friáveis. Hemorragias petequiais e equimóticas podem estar presentes também no fígado e nos músculos esqueléticos. Corpos de inclusão são encontrados nos hepatócitos (TORO et al., 2001; ADAIR; FITZGERALD, 2008; ALEMNESE et al., 2010).

Durante surtos de hepatite por corpos de inclusão, foi encontrada alta incidência de glomerulonefrite após estudos histopatológicos, com lesões glomerulares compatíveis com a forma proliferativa ou membrano proliferativa da glomerulonefrite (WILSON et al., 2010).

Além do fígado, adenovírus aviário do tipo 1 tem como principais sítios de replicação ao trato digestivo o sistema respiratório superior. Amostras para o diagnóstico devem incluir fezes ou intestinos com seu conteúdo e também uma alíquota do órgão afetado. O vírus frequentemente também é encontrado na faringe e nos rins (McFERRAN, 1998).

Existem descrições de infecção por adenovírus do tipo 1 que resultaram na diminuição do consumo de alimento. Estudos experimentais com galinhas inoculadas determinaram a diminuição do consumo de alimento e do peso corporal, com acúmulo excessivo de gordura e alta mortalidade (TORO et al., 2001; ONO et al., 2007; OJKIC et al., 2008; PANTIN-JACKWOOD et al., 2008).

Adenovírus aviário do tipo 1 foi encontrado em pintinhos com proventriculite, nanismo e baixa conversão de alimento. Macroscopicamente os proventriculos estavam inchados e a mucosa estava coberta com material necrótico ou hemorragias. Microscopicamente existia uma intensa infiltração linfóide na mucosa e granulosa, sugerindo que o adenovírus aviário do tipo 1 poderia produzir proventriculite e comprometer o desenvolvimento, originando o nanismo e baixa conversão alimentar (KOUWENHOVEN; DAVELAAR; VAN-WALSUN, 1978). Adenovírus aviário do tipo 1 foi relacionado com ventriculite em codornas, frangos de corte e galinhas,

produzindo erosões e úlceras na moela, e mostrando nos exames histopatológicos corpos de inclusão por este vírus (GOODWIN, 1993).

Adenovírus aviário do tipo 1 tem transmissão vertical, e dessa forma pode ocorrer em ovos embrionados, motivo que levou a se estabelecer lotes livres de patógenos específicos (*SPF*) (TORO et al., 2001). A transmissão horizontal também é importante, pois o vírus está presente nas fezes, mucosa traqueal e nasal, fígado, rins e inclusive no sêmen. Embora o vírus possa ser transmitido através de todas as excreções, os títulos virais maiores foram encontrados nas fezes (ONO et al., 2007).

O gene HEXON foi usado para a detecção e diagnóstico viral através da PCR (JIANG et al., 1999; TORO et al., 1999; ALVARADO et al., 2007; OJKIC et al., 2008; MASE et al., 2009; WILSON et al., 2010), porém têm se desenvolvido alterações no método que estão aumentando a sensibilidade do diagnóstico com a capacidade de detectar adenovírus aviário do tipo 1, 2 e 3 (MASE et al., 2009).

2.1.5 Coronavírus aviário

Coronavírus Aviário produz doença entérica, respiratória e renal. Em galinhas jovens, em crescimento, causa doença respiratória, se observando também redução do ganho de peso e da eficiência alimentar. A infecção predispõe à aerosaculite bacteriana, pericardite e perihepatite, produzindo mortalidade de até 30%. Outras manifestações da bronquite infecciosa inclui diminuição da produção de ovos, seguida de doença respiratória típica e presença de lesões nos rins (CAVANAGH; GELB, 2008).

O vírus da bronquite infecciosa é redondo com características pleomórficas, O vírus adquire o envelope lipídico como resultado de gemações de membrana obtidas do retículo endoplasmático. O envelope tem aproximadamente 120 nm de diâmetro com várias projeções claviformes de superfície (espículas). Este vírus contém três estruturas maiores que são

componentes da partícula viral (virion): a glicoproteína da espícula (S) e da membrana (M), a nucleoproteína interna (N) e a proteína pequena de membrana (E), que é essencial para a formação viral. A glicoproteína S inclui os glicopeptídeos S1 e S2 e está relacionada com a inibição da hemaglutinação e com os anticorpos relacionados com a neutralização viral. Tem genoma RNA de cadeia simples de senso positivo com aproximadamente 27.600 nucleotídeos (GUY, 1998; 2008; CAVANAGH; GELB, 2008).

A glicoproteína S produz a união do envelope do vírus com a superfície celular ou membrana endossomal da célula, liberando o RNA no citoplasma celular (CAVANAGH, 2005). A replicação viral é intracitoplasmática sem a formação de corpos de inclusão, sendo que cinco RNA mensageiros são produzidos por um mecanismo descontínuo de transcrição. Três destes são responsáveis pela produção das proteínas virais S, M e N, enquanto os restantes são responsáveis pela produção das proteínas não estruturais e da proteína E. A função das proteínas não estruturais é desconhecida (CAVANAGH, 2005). Partículas virais se acumulam e são liberadas da célula infectada por lise ou por migração das vesículas à membrana celular onde a vesícula e a membrana se fundem e ocorre a liberação do vírus (GUY, 1998; CAVANAGH, 2005).

O vírus da bronquite infecciosa das galinhas é membro da família *Coronaviridae*, que inclui dois gêneros *Coronavirus* e *Torovirus*. O vírus da bronquite infecciosa das galinhas está no grupo três do gênero *Coronavirus* onde se encontram coronavírus de outras espécies aviárias. Os grupos um e dois incluem coronavírus de mamíferos. Coronavírus são vírus RNA, que infectam uma ampla variedade de aves e mamíferos (GUY, 1998).

O vírus da bronquite infecciosa foi observado pela primeira vez nos Estados Unidos, em Dakota do Norte, em 1930. Sinais clínicos e estudos preliminares de laboratório determinaram em 1931, a primeira descrição de bronquite infecciosa (CAVANAGH; GELB, 2008).

Na avicultura foram identificados o vírus da bronquite infecciosa das galinhas (BIG) e o coronavírus dos perus (TCoV), relacionados com doenças respiratórias e entéricas em galinhas e perus, respectivamente (CAVANAGH, 2005). Coronavírus com proteínas muito similares às presentes no vírus da bronquite infecciosa das galinhas foram isolados de faisão (*Phasianus colchicus*), perus, galinhas de Angola (*Numida meleagris*), perdiz (*Alectoris* sp.), pavão (*Pavo cristato*), e não galináceos (*Anas* sp.) (CAVANAGH, 2005; CAVANAGH; GELB, 2008).

A maioria dos isolados do vírus da bronquite infecciosa das galinhas se replica bem em ovos embrionados de galinha de 10-12 dias de idade, por inoculação via câmara alantóide. Provocam lesões como nanismo e enrolamento do embrião e pés, sendo que a mortalidade aumenta com o número de passagens nos ovos. Embaixo da câmara de ar do ovo, o embrião se encontra enrolado com aparência de uma esfera com os pés deformados e comprimidos contra a cabeça, com a membrana amniótica aderida e espessada (CAVANAGH; GELB, 2008). Coronavírus entérico dos perus pode ser isolado em ovos embrionados inoculados por via câmara alantóide, o vírus pode ser identificado nos intestinos por imunofluorescência (GUY, 1998).

O vírus da bronquite infecciosa das galinhas foi isolado em ovos embrionados de galinha, após a inoculação de amostras obtidas de suabes de cloaca e *pools* de ovário e oviduto de galinhas poedeiras com histórico de diminuição da produção de ovos. O vírus foi identificado usando a reação de precipitação, hemaglutinação, testes de neutralização e de outras características físico-químicas (MAITI; SHARMA; SAMBYAL, 1985).

A infecção do vírus da bronquite infecciosa das galinhas se inicia nas vias respiratórias, porém, depende do tropismo da cepa e esta pode se iniciar em outro órgão (rins, gônadas, intestinos). A replicação viral produz lesões em vários tipos de células epiteliais como: traquéia, glândula de Harder, pulmão, sacos aéreos, rins e gônadas (oviduto e testículos) (CAVANAGH; GELB, 2008). Estudos experimentais demonstraram que a distribuição viral pode ocorrer nos seguintes tecidos: no sangue e fígado após quatro (04) dias da inoculação, presença de lesões nos sacos aéreos no quinto dia após a inoculação; na traquéia, pulmão, pâncreas, rim e bursa de Fabricius após sete (07) dias da inoculação; persistindo na bursa de Fabricius e desaparecendo dos outros tecidos aos 12 dias de infecção (HOFSTAD; YODER, 1966).

Estudos realizados mostraram também que o vírus da bronquite infecciosa das galinhas cresce e se desenvolve em várias células do trato digestivo (esôfago, proventrículo, duodeno, jejuno, bursa de Fabricius, tonsilas cecais, reto e cloaca), com efeitos clínicos moderados. Cepas provenientes da Ásia produziram lesões no ventrículo. O vírus da bronquite infecciosa permanece no trato digestivo em galinhas jovens e em poedeiras com ausência de sinais clínicos. O vírus da bronquite infecciosa destrói as células que infecta, predispondo às infecções bacterianas

secundárias especialmente por *E. coli*, que produz aerosaculite e colibacilose sistêmica (CAVANAGH; GELB, 2008; XIAO et al., 2010).

Perus de todas as idades são susceptíveis ao coronavírus entérico dos perus, infecção que se caracteriza por depressão, diarreia líquida, perda de peso e desidratação. Lesões consideráveis são encontradas nos intestinos, que estão distendidos com conteúdos aquosos e gasosos. Lesões microscópicas estão presentes no epitélio das vilosidades intestinais. A atrofia das vilosidades é evidente nos intestinos com aumento do número de células mononucleares na lâmina própria e perda das microvilosidades (GUY, 1998).

No Brasil, foram identificados coronavírus com identidade antigênica similar ao vírus da bronquite infecciosa das galinhas, isolado de galinhas de Angola próximas a criações comerciais de frangos de corte que apresentavam mortalidade, enterites e diminuição do consumo de alimento. Estudos experimentais com este vírus demonstraram que o vírus produzia doença respiratória e fezes líquidas em frangos de corte e galinhas de Angola (CAVANAGH; GELB, 2008).

O vírus da bronquite infecciosa das galinhas foi identificado pela amplificação do gene UTR usando a RT-PCR, em aves comerciais com problemas entéricos, faisões, pavões, perdizes e codornas, fazendo do teste molecular uma ferramenta importante no diagnóstico (CAVANAGH et al, 2002; CAVANAGH, 2005; LIU et al., 2005; CIRCELLA et al., 2007; BUNGER et al., 2009).

2.1.6 Rotavírus aviário

Rotavírus aviário causa doença entérica em uma ampla variedade de espécies aviárias. Rotavírus são vírus aproximadamente esféricos, icosaédricos, não envelopados, com diâmetro de 75 nm, possuem um genoma de RNA. Rotavírus compreende o gênero *Rotavirus* dentro da

família *Reoviridae*, esta família contém 12 gêneros, que infectam vertebrados, invertebrados, plantas e fungos (ESTES; KAPIKIAN, 2007).

O nome rotavírus provém do latim *rota* que significa roda. Rotavírus foi descrito como um vírus semelhante ao reovírus, mas pode ser distinguido destes por sua superfície externa mais claramente definida. A partícula viral de um rotavírus maduro tem perto de 100 nm em diâmetro e possui três estruturas proteicas icosaédrica no capsídeo. Sessenta espículas proteicas se estendem da superfície interna até a superfície externa, que necessitam de cálcio para manter a sua integridade. A partícula viral contém uma polimerase RNA dependente de RNA e outras enzimas (ESTES; KAPIKIAN, 2007).

O genoma do vírus contém 11 segmentos de cadeia dupla de RNA (dsRNA). Cada segmento de RNA consiste de uma estrutura aberta de leitura (ORF) que codifica uma proteína. A morfogênese viral envolve a aquisição temporária de um envelope lipídico e da deposição de glicoproteínas codificadas do vírus no retículo endoplasmático (ESTES; KAPIKIAN, 2007; McNULTY; REYNOLDS, 2008). Dez cadeias polipeptídicas virais foram detectadas em células MA-104 infectadas com rotavírus de peru. Três cadeias polipeptídicas denominadas VP1, VP2 e VP6 foram associadas a partículas que não possuía cápside externa. As proteínas VP3, VP4, VP5 e VP7 formam a cápside externa. Partículas virais maduras são não envelopadas, e os virions são liberados da célula infectada por lise celular ou por transporte vesicular não clássico em células epiteliais polarizadas. A clivagem de VP4 produz VP5 e VP8 e aumenta a infectividade viral (ESTES; COHEN, 1989; PATTON, 1995; GUY, 1998; McNULTY, 2003; ESTES; KAPIKIAN, 2007).

A replicação viral ocorre no citoplasma celular, tanto *in vivo* como em cultura celular, núcleos virais são formados dentro das matrizes de material precursor viral (viroplasma) que permanece livre no citoplasma em forma de partículas de diferente tamanho, porém não foram encontrados no núcleo celular. As partículas virais desenvolvidas são liberadas dentro de cisternas dilatadas de retículo endoplasmático rugoso, muitas parecem brotar nas áreas livres de ribossomos do retículo endoplasmático, adquirindo um envelope neste processo (PATTON, 1995; GUY, 1998; McNULTY, 2003).

Ao nível gênico, rotavírus de galinha e rotavírus de peru são diferentes e se encontram em ramos separados em uma árvore filogenética. No entanto, novos isolados de rotavírus de galinha apresentaram grande semelhança com o rotavírus de peru nos segmentos das proteínas VP6, VP7 e NSP-5, mas as sequências gênicas de VP4 mostraram sequências desconhecidas, sugerindo uma transmissão interespecies e redistribuição do rotavírus aviário do grupo A em condições de campo (SCHUMANN et al., 2009).

As partículas de rotavírus são estáveis a um pH 3,0 e resistentes ao éter e clorofórmio, desinfetantes iodoformos, glutaraldeído e hipoclorito inativa o vírus (McNULTY; REYNOLDS, 2008).

Estes vírus foram identificados pela primeira vez em aves, em 1977, por Bergeland et al., (1977), quem os associaram como os causadores de enterites em perus. Desde então foram identificados em aves de vida livre e domésticas, incluindo galinhas, perus, patos e faisões (GUY, 1998).

Em mamíferos e aves, infecção por rotavírus está associada com surtos de diarreia. O significado econômico das enterites por rotavírus na indústria avícola não foi definido, mas se fazendo uma analogia com o que ocorre em mamíferos, provavelmente seria significativa (McNULTY; REYNOLDS, 2008). Em humanos, rotavírus é a mais importante causa de doença diarreica severa em crianças e jovens em todo o mundo, sendo uma das doenças mais comuns e que maior número de mortes causa (ESTES; KAPIKIAN, 2007).

Rotavírus do grupo A foi estabelecido como causador de doença diarreica em crianças e em animais jovens de várias espécies de mamíferos e aves. Rotavírus do grupo B foi associado com epidemias severas de diarreia em humanos adultos na China e em porcos adultos. Rotavírus do grupo C foi esporadicamente diagnosticado em surtos de diarreia em humanos (ESTES; KAPIKIAN, 2007). A diarreia associada com a infecção por rotavírus foi atribuída à diminuição na absorção de D-xilose do trato intestinal e outros carboidratos como glicose, que possibilitam a fermentação bacteriana, produzindo metabólitos que atraem água para dentro do trato intestinal e consequentemente produzem diarreia (McNULTY; REYNOLDS, 2008).

Rotavírus aviário foi isolado de fezes ou do conteúdo intestinal de perus, frangos, faisões, patos e pombas em cultura celular primária de rins e fígado de embrião de galinha. Assim como em células MA-104, produzindo títulos virais elevados no cultivo primário de embrião de galinha, reduzindo o número de passagens e facilitando o isolamento (MYERS; SCHAT, 1989). No entanto, foi demonstrado que o tratamento com tripsina era necessário para aumentar a sua infectividade, otimizando o isolamento e a propagação viral (McNULTY et al., 1979; McNULTY et al., 1980; KANG; NAGARAJA; NEWMAN, 1986; McNULTY; REYNOLDS, 2008).

Rotavírus aviário atinge principalmente aves jovens, foram detectados por microscopia eletrônica e RT-PCR em amostras de fezes provenientes de perus de cinco (05) semanas de idade com diarreia, de perus afetados com a síndrome entérica caracterizada por diarreia, quantidades anormais de gás e fluido no trato intestinal, ceco e inflamação da cloaca, alterações secundárias incluíam desidratação, retardo do crescimento e empastamento da cloaca (SPACKMAN; DAY; PANTIN-JACKWOOD, 2010).

Pintinhos *SPF* de um dia e frangos de quatro (04) semanas de idade foram susceptíveis à infecção com rotavírus aviário isolado de galinhas. O vírus foi detectado por microscopia eletrônica nas fezes dos animais infectados por via oral, entre o segundo e o oitavo dia pós-infecção. Os animais apresentaram um quadro de diarreia, desidratação, diminuição do ganho de peso e mortalidade. Anticorpos foram detectados por imunofluorescência no soro das aves de três (03) semanas de idade. Partículas virais foram observadas no citoplasma das células das vilosidades intestinais, localizadas primeiramente dentro das cisternas dilatadas do retículo endoplasmático rugoso (McNULTY et al., 1981; McNULTY; REYNOLDS, 2008).

Rotavírus aviário proveniente de galinhas foi associado com distúrbios entéricos, caracterizados por nanismo e sinais como diarreia, apetite pobre ou anormal, conteúdos intestinais gasosos ou fluidos anormais e aumento da mortalidade (McNULTY et al., 1980; McNULTY; REYNOLDS, 2008;). Nos Estados Unidos criadores de perus e veterinários observaram uma doença entérica em perus jovens, chamada Síndrome enterica dos perus (*PES*). A *PES* é definida como uma infecção multifatorial de perus jovens identificada entre a primeira e

a sétima semana de idade. Sinais clínicos incluíam diarreia, depressão e letargia (JINDAL et al., 2009).

Estudos longitudinais em granjas comerciais para a detecção de vírus entéricos em conteúdos intestinais coletados de perus demonstraram a presença de rotavírus aviário (67,7 %) na maioria das amostras analisadas (PANTIN-JACKWOOD et al., 2008).

A distribuição do rotavírus aviário é mundial, estes são excretados pelas fezes, sendo a transmissão horizontal a forma mais importante de contágio (McNULTY; REYNOLDS, 2008).

Na Hungria, estudos epidemiológicos detectaram rotavírus em aves de vida livre, usando técnicas moleculares, e determinaram uma baixa prevalência do rotavírus aviário do Grupo A, estes dados sugerem que as infecções por rotavírus poderiam ocorrer em um amplo espectro de espécies de aves de vida livre, por conseguinte é importante a vigilância do rotavírus para se descobrir a diversidade de cepas aviárias do vírus (URSU et al., 2011).

Estudos experimentais destinados a reproduzir a doença entérica em galinhas e perus, inocularam por via oral rotavírus aviário e não encontraram lesões aparentes, mas o ceco se apresentou distendido e com material espumoso. Partículas virais foram encontradas, usando microscopia eletrônica, nas células epiteliais do intestino delgado (YASON; SCHAT, 1986).

Vários rotavírus aviários não apresentaram relações antigênicas com outros rotavírus de mamíferos e aviários conhecidos, mostrando que estes vírus não possuem ou não compartilham o grupo antigênico já caracterizado. Dessa forma, o diagnóstico por testes sorológicos pode ser pouco eficaz, mostrando assim a necessidade do uso de testes moleculares como a RT-PCR (McNULTY et al., 1981; DAY; SPACKMAN; PANTIN-JACKWOOD, 2007; PANTIN-JACKWOOD et al., 2008; SCHUMANN et al., 2009; SPACKMAN; DAY; PANTIN-JACKWOOD, 2010).

2.1.7 Reovírus aviário

Reovírus aviário é um importante patógeno que afeta as aves e que pode causar consideráveis perdas econômicas na avicultura. Primeiramente foi relacionado como agente patogênico que induzia tenosinovite e depois foi associado com várias doenças na avicultura, incluindo doenças entéricas e respiratórias, miocardite, hepatite e a chamada síndrome do nanismo e diminuição do ganho de peso (*Runting and Stunting Syndrome*), porém a única ligação entre a presença do vírus e a doença foi demonstrada na síndrome da artrite viral (tenosinovite), caracterizada pelo inchaço das articulações e por lesões no tendão do gastrocnêmico (JONES, 2000, 2008; BENAVENTE; MARTINEZ-COSTAS, 2007).

Reovírus são vírus não envelopados, com simetria icosaédrica e dupla cápside externa. Partículas virais intactas têm um diâmetro de aproximadamente 75 nm. O genoma de cadeia dupla de RNA (*dsRNA*) contém dez segmentos de RNA que são classificados de acordo com seu peso molecular em três grupos, designados L (grande), M (médio), e S (pequena). O genoma se encontra dentro de uma dupla cápside, não envelopada, icosaédrica, com um diâmetro de 85 nm e uma densidade de 1,37 g/mL. O RNA do tipo L contém três segmentos: L1, L2, L3, os do tipo M apresenta os segmentos M1, M2, M3 e existem quatro segmentos para o tipo S (S1, S2, S3, S4). O genoma do reovírus aviário expressa 12 produtos primários de translação, dos quais oito são proteínas estruturais que se encontram incorporadas dentro da progênie dos virions, as outras quatro proteínas são não estruturais e são expressas nas células infectadas, mas não são encontradas nos reovírus maduros (BENAVENTE; MARTINEZ-COSTAS, 2007). O gene L codifica três cadeias polipeptídicas λA , λB , λC , o gene M codifica as cadeias polipeptídicas μA , μB , μNS . O genoma S contém três estruturas de leitura abertas (σA , σB , σNS), as quais traduzem as proteínas de fusão de membrana p10, p17 e a proteína de ligação à membrana, σC (TOURIS-OTERO et al., 2004). A proteína p17 se acumula no nucleoplasma de células transfectadas e infectadas, e pode participar no processo nuclear celular como um gene de transcrição e de ligação de DNA. A proteína p53 é um regulador de captura do ciclo celular, apoptose e reparo do DNA ou senescência, a mesma que é induzida pela ação viral. A proteína p21^{cip1waf1} é a mediadora do crescimento celular induzida pela proteína p53 (LIU et al., 2005). Estudos de

filogenia determinaram que as cepas isoladas de galinhas com RSS apresentavam uma heterogeneidade gênica mostrando um possível novo genótipo da proteína σ C (GOLDENBERG et al., 2010; BANYAI et al., 2011).

A replicação viral ocorre no citoplasma da célula infectada, a partícula viral se une à membrana da célula. A união do reovírus aviário com as células é mediada por interações específicas entre a proteína σ C da cápside externa e os receptores proteicos celulares de superfície. Todos os vírus devem atravessar a membrana celular para expressar seu genoma dentro das células. Dentro destes vacúolos, a cápside externa do reovírus sofre clivagens proteolíticas. A proteólise da cápside é uma etapa fundamental no processo de infecção e pode ser mediado por uma variedade de proteases celulares. Após a clivagem da cápside externa os vírus são liberados dentro do citoplasma e a partícula viral se torna transcricionalmente ativa e começa a síntese de RNA mensageiros (RNAm) que contém uma sequência de nucleotídeos igual ao do dsRNA. Estes produtos de transcrição primária são usados para a tradução de proteínas virais nas inclusões citoplasmáticas de morfologia globular que são conhecidas como viroplasmas (TOURIS-OTERO et al., 2004; SCHIFF; NIBERT; TYLER, 2007). Os RNA mensageiros exercem duas funções na célula infetada: programar a síntese de proteína viral nos viroplasmas e servir como molde para a síntese de dsRNA. O genoma do reovírus aviário codifica 12 produtos primários de translação, dos quais oito (08) são componentes estruturais da partícula viral e quatro (04) são proteínas não estruturais (NS), as quais são sintetizadas na célula infectada, mas não são incorporadas dentro da partícula viral adulta. Estes componentes estruturais formam a cápside interna a qual é envolvida por outros componentes estruturais que formarão a cápside externa, gerando o vírus maduro, processo que ocorre dentro dos viroplasmas ou fábricas virais (TOURIS-OTERO et al., 2004).

Em aves a replicação do reovírus foi descrita em vários tecidos, mas os sítios alvos do vírus são os intestinos, articulação tíbio tarso ou tarsometatarsal e fígado (TOURIS E OTERO et al., 2004; BENAVENTE; MARTINEZ-COSTAS, 2007; JONES, 2008).

Reovírus aviário são membros do gênero *Orthoreovirus*, um dos doze gêneros da família *Reoviridae*. O gênero *Orthoreovirus* compreende quatro subgrupos, o reovírus de mamíferos (MRV) não fusogênico que representam o subgrupo 1, o reovírus aviário (ARV) e o vírus Nelson

Bay isolado de morcegos (*flying fox*) se classificam no subgrupo 2, o reovírus isolado de babuíno que representa o subgrupo 3, e as variantes fusogênicas do vírus, isoladas de répteis formam o subgrupo 4 (MERTENS, 2004).

Embora Reovírus aviário e reovírus de mamíferos compartilhem muitas características morfológicas e físico-químicas, diferem nos hospedeiros, patogenicidade e capacidade de codificação do genoma, assim como, em várias propriedades sorológicas e biológicas (BENAVENTE; MARTINEZ-COSTAS, 2007; JONES, 2008).

Reovírus aviário é estável em um pH entre 3,0 e 9,0. É muito resistente às condições ambientais, pois permanece viável por dez dias sobre penas, maravalha, ração, por quatro (04) dias em papel ou algodão, sendo que o tempo de sobrevivência aumenta na presença de material fecal ou orgânico. Nas cascas dos ovos sobreviveram por dez dias com diferentes perdas de infectividade, mostrando a necessidade de se realizar um adequado descarte do material contaminado e usado nas criações (JONES, 2000; SAVAGE; JONES, 2003).

Em 1972 foi descrita uma sinovite em galinhas, sendo foi isolado um agente resistente a clortetraciclina e furazolidona, por testes sorológicos não foi relacionado ao *Micoplasma gallisepticum* ou *M. synoviae*. Este agente foi denominado agente da artrite viral e foi identificado como um reovírus (JONES, 2008).

Reovírus aviário replica em ovos embrionados inoculados tanto pelo saco da gema como pela câmara corioalantóide, mas a inoculação pelo saco da gema é a melhor para o isolamento (GUNERATNE; JONES; GEORGIU, 1982). O vírus causa mortalidade três a cinco dias após a inoculação, com embriões muito hemorrágicos, com nanismo e ocasionalmente alongamento do pâncreas e fígado que apresenta aparência amarela esverdeada. O vírus cresce em culturas celulares primárias de pulmão, rins, fígado, macrófagos e testículo, sendo as mais susceptíveis ao isolamento as culturas de fígado e rins (GUNERATNE; JONES; GEORGIU, 1982; MORADIAN; THORSEN; JULIAN, 1990). Reovírus aviário em cultura celular produz a formação de sincício que é o efeito citopático típico, o qual pode acontecer entre 24-48 horas após a infecção, seguido de degeneração, produzindo buracos na monocamada celular com células gigantes. Células infectadas apresentam inclusões intracitoplasmáticas que podem

aparecer eosinofílicas ou basofílicas. (JONES, 2000; TOURIS E OTERO et al., 2004; JONES, 2008).

Reovírus aviário induz fusão celular, que os diferencia filogeneticamente de outros reovírus de animais. A formação de sincícios em cultura celular aumenta o efeito citopático (TOURIS E OTERO et al., 2004). Estudos de propagação de reovírus aviário em várias linhagens celulares como VERO, HeLa, BHK, MA-104 demonstraram que a proteína não estrutural p17 produz diminuição do crescimento e proliferação celular através da ativação das proteínas p53 e p21^{cip1waf1} (LIU et al., 2005).

Este vírus foi relacionado com a síndrome de nanismo e retardo do crescimento (RSS) que se caracteriza pela perda de peso e que está associado com vários possíveis agentes causais. Estudos descreveram uma degeneração vacuolar e desprendimento da mucosa do intestino delgado dois dias após a inoculação oral de reovírus aviário associado com doença entérica em galinhas e pintinhos, as lesões se mantiveram até o sétimo dia após a inoculação. Ocorreram lesões macroscópicas como intestinos pálidos e distendidos com conteúdos mucosos e aquosos. Apesar da replicação no epitélio intestinal e das lesões no intestino delgado incluindo alterações nas vilosidades, este vírus sozinho não produz a doença entérica, porém em associação com outros vírus entéricos patogênicos podem induzir a doença entérica, mas nem sempre induz a diminuição do ganho de peso (MORADIAN; THORSEN; JULIAN, 1990; SONGSERM et al., 2003; BANYAI et al., 2011).

Quando inoculado por via oral, em pintinhos de um dia de idade mostraram a presença do vírus no plasma, eritrócitos e em células mononucleares do sangue 30 horas após a inoculação, e uma ampla distribuição nos tecidos, incluindo a superfície óssea. A maior concentração viral foi encontrada no fígado e nos tecidos entéricos, especialmente no duodeno, pâncreas, íleo, tonsilas cecais e reto entre os dias um e cinco pós-infecção, demonstraram que o vírus atinge o intestino e fígado poucas horas depois de ser inoculado (KIBENGE et al., 1985).

A transmissão do reovírus aviário é principalmente horizontal, pode ser excretado pelo trato respiratório e trato digestivo, ocorrendo geralmente nas fezes sugerindo a contaminação fecal como fonte primária de infecção. No entanto, foi descrita também a transmissão vertical (JONES, 2008).

Associações de reovírus aviário com outros patógenos como adenovírus, vírus da anemia das galinhas e *Cryptosporidium sp.* são comuns, e estas se caracterizam por diarreia, hemorragias intestinais, atrofia do timo, baço e bursa de Fabricius. Sinergismos que produzem significativa perda de peso, e danos em diferentes tecidos como intestinos, fígado, pâncreas e bursa. O epitélio da bursa de Fabricius apresentou degeneração vacuolar entre quatro a sete dias após a infecção (GUY et al., 1987; MORADIAN; THORSEN; JULIAN, 1990; SONGSERM et al., 2003; JONES, 2008).

Estudos experimentais demonstraram um aumento de linfócitos T CD8+ na lâmina própria do intestino delgado, especialmente do jejuno, mostrando que o vírus pode ser o agente causador das lesões no epitélio das vilosidades intestinais (SONGSERM et al., 2003).

Vacinas contra reovírus aviário são usadas para a prevenção do desenvolvimento de artrite viral, porém nem sempre os resultados são ótimos, ocorrendo surtos da doença depois da vacinação, fato que pode ser esclarecido pela grande variabilidade gênica que a proteína sigma C apresenta, entre a cepa vacinal 1130 e outros isolados do reovírus aviário (GOLDENBERG et al., 2010). A vacinação de matrizes com a cepa de reovírus aviário RAM-1, produz transferência passiva de anticorpos à progênie, prevenindo o desenvolvimento de tenosinovite na progênie infectada experimentalmente com vírus homólogo, porém não houve proteção contra a infecção com cepas heterólogas do vírus (MEANGER et al., 1997).

Reovírus aviário foi identificado tanto em lotes de perus e frangos aparentemente saudáveis como nas aves que apresentavam doença entérica, principalmente com diarreia, através da RT-PCR (PANTIN-JACKWOOD et al., 2008; SPACKMAN; DAY; PANTIN-JACKWOOD, 2010).

2.2 ISOLAMENTO E PROPAGAÇÃO VIRAL

A presença de um vírus é evidenciada inicialmente pelos efeitos nocivos no organismo hospedeiro, o que inclui um amplo espectro de sintomas, incluindo lesões na pele e mucosas, assim como, desordens digestivas, respiratórias ou neurológicas; alterações imunológicas, falhas em órgãos específicos e morte (CARTER; SAUNDERS, 2007).

Os vírus podem ser isolados de um hospedeiro infectado a partir de material excretado ou secretado, sangue e tecidos. Assim como, podem induzir uma infecção em um hospedeiro similar ou em uma cultura celular (CONDIT, 2007). Historicamente, cães, gatos, coelhos, ratos, porquinhos da Índia, hamster, camundongos e pintinhos se mostraram ótimos modelos experimentais, atualmente, a maioria destes sistemas foi substituída por métodos de cultura celular (SCHAT; PURCHASE, 1998; CONDIT, 2007).

O isolamento viral tem como objetivo aumentar o número de partículas virais, motivo pelo qual foram desenvolvidos vários procedimentos para o cultivo viral (SENNE, 1998).

Cada vez que um vírus é sub-cultivado em uma linhagem celular, cultivo celular primário ou em ovos embrionados, recebe o nome de passagem. Quando um vírus é isolado pela primeira vez este se replica pobremente nas células, mas depois de se realizar passagens progressivas o vírus replicará eficientemente. Depois de um número de passagens o vírus pode se adaptar ao novo hospedeiro e se for geneticamente diferente à cepa viral original, este será considerado uma nova cepa de laboratório. Na maioria das vezes esta adaptação ocorre com a perda de virulência e patogenicidade, e isto pode dificultar a caracterização do vírus selvagem, porém esta é uma maneira de produzir vacinas virais atenuadas (CONDIT, 2007).

2.2.1 Cultura Celular

A maioria das células usadas no isolamento viral procede de humanos ou outras espécies animais, e são denominadas linhagens celulares. As linhagens celulares são células que foram imortalizadas, ou seja, que podem ser cultivadas indefinidamente. Algumas vezes é difícil encontrar uma linhagem celular na qual os vírus possam se replicar (BAXENDALE; MABATSION, 2004; CONDIT, 2007). As células são cultivadas em um meio rico em aminoácidos, sendo este suplementado com soro animal, o qual contém substâncias que promovem o crescimento celular, mantém a pressão osmótica e o pH para as células. Vírus podem ser cultivados em células com crescimento em superfícies planas, mergulhadas em meio de cultura, sendo que estas se encontram dispostas em forma de um tapete conhecido como monocamada. Alternativamente, as células podem estar em suspensão no meio, o qual é agitado continuamente celular para que estas se mantenham em suspensão. O principal problema da propagação viral em linhagens celulares é a contaminação bacteriana ou fúngica, motivo pelo qual é imprescindível se trabalhar em um ambiente estéril (CHAT; PURCHASE, 1998; CARTER; SAUNDERS, 2007).

2.2.2 Ovos Embrionados de Galinha

Antes do aparecimento das culturas celulares, os vírus eram propagados em animais de laboratório ou em ovos embrionados de galinha. O uso de ovos embrionados de galinha foi introduzido à virologia por Goodpasture em 1932 e desenvolvido por Beveridge e Burnet em 1946. O desenvolvimento do embrião de galinha, depois da fertilização, oferece uma grande variedade de tecidos diferenciados, como os sacos amniótico, alantóide e da gema, os quais servem como substrato para o crescimento de diferentes vírus como adenovírus aviário, vírus da encefalomielite aviária, influenza aviária, coronavírus aviário entre outros (MODAK, 2003; ADAIR; FITZGERALD, 2008; CABANAGH; GELB, 2008; GUY, 2008; ALEMNESH et al.,

2010). Muitos vírus produzem alterações características quando são introduzidos nas câmaras e membranas internas do ovo embrionado, sendo, portanto um método de identificação da presença viral que serve de referência para a quantificação e determinação da patogenicidade viral (VILLEGAS, 1998).

O sucesso do isolamento, propagação e cultivo viral depende das seguintes condições: via de inoculação, idade do embrião, temperatura de incubação, tempo de incubação após a inoculação, volume e diluição do inoculo usado e a condição imunológica do lote de onde provêm os ovos (HIERHOLZER; KILLINGTON, 1996; SENNE, 1998).

Os ovos embrionados compreendem o desenvolvimento do embrião e das membranas de suporte que possuem cavidades fechadas ou sacos. Embaixo da casca do ovo se encontra a membrana da casca, que cobre seu interior e forma a câmara de ar no extremo do ovo. A casca do ovo e a membrana da casca permite a difusão de gases para dentro e fora do ovo e a integridade microbiológica deste. A distribuição dos gases dentro do ovo é facilitada pela membrana corioalantóide (CAM), membrana que se forma adjacente à membrana da casca, altamente vascularizada e que serve de órgão respiratório do embrião. Durante o desenvolvimento, esta membrana forma uma câmara relativamente larga conhecida como saco alantóide, que contém entre cinco (05) e 10 mL de líquido alantóide. O embrião é envolvido pela membrana amniótica que forma o saco amniótico que contém um (01) a dois (02) mL de fluido amniótico. O embrião é unido intimamente ao saco da gema, que está localizado aproximadamente no centro do ovo e possui os nutrientes necessários para o desenvolvimento embrionário, transmitindo os suplementos alimentícios ao embrião através do intestino, órgão alvo dos vírus entéricos. A formação do precursor do sistema digestivo se inicia 18 horas após a incubação (SENNE, 1998; GUY, 2008).

Durante a embriogênese, a vasculatura do saco da gema nutre as células hematopoiéticas e os tecidos intraembrionários em desenvolvimento. As células hematopoiéticas, a vasculatura do saco da gema e as células da superfície muscular são derivadas do mesoderma extraembrionário (NAKAZAWA et al., 2006). A estreita relação entre o endoderma do saco da gema e a vasculatura derivada do mesoderma lembra a relação existente entre o intestino e o fígado, relacionando o saco da gema com outras importantes funções além da suplementação de

nutrientes para o crescimento embrionário. Assim, é a principal fonte de lipídeos e proteínas que constituem o soro embrionário nos primeiros dias de idade e desempenha um papel importante na regulação da integridade vascular do embrião em desenvolvimento (KANAZAWA et al., 2011).

O endoderma do saco da gema é parte da membrana do saco da gema. O mesoderma do saco da gema contém a camada somatopleural (composto principalmente de células musculares lisas) e a camada esplancnopleural (composta por músculo liso, endotélio vascular e células sanguíneas) e está intimamente ligado ao endoderma. A principal função do endoderma do saco da gema é a absorção de lipídios e outros constituintes da gema e a sua transferência para a circulação embrionária através do intestino (KANAZAWA et al., 2011). A gema é a fração mais rica do ovo e se encontra separada da albumina pela membrana vitelina (VIEIRA, 2007). A gema do ovo possui principalmente lipídeos, a partir dos quais se originam grandes quantidades de ácidos graxos de cadeia longa que são transferidos à circulação embrionária, o endoderma do saco da gema armazena glicogênio (KANAZAWA et al., 2011).

Existem quatro vias comumente usada para a inoculação em ovos embrionados: saco alantóide, saco da gema, CAM, e saco amniótico. A via da CAM é a preferida devido a sua alta sensibilidade a maioria dos vírus e por ter menos probabilidade de ser afetada por contaminação bacteriana. Os sacos da gema e o alantóide têm sensibilidade similar para o isolamento de vários agentes. Para cada inoculação devem ser utilizados no mínimo três embriões (SENNE, 1998). Antes da inoculação, os ovos precisam ser visualizados em um ovoscópio, para se determinar a viabilidade dos embriões e se marcar o sítio da inoculação (GUY, 2008).

A idade dos embriões é muito importante no momento da inoculação e é determinante para a escolha da via de inoculação que será utilizada. Embriões de 10 a 12 dias de idade são utilizados para a inoculação por via câmara alantóide, embriões de seis (06) a oito (08) dias de idade são utilizados para a inoculação por via saco da gema, embriões de 10 a 11 dias de idade são utilizados para a inoculação por via membrana corioalantóide (SENNE, 1998; ALVARADO et al., 2007; GUY, 2008; ALEMNESH et al., 2010).

Os ovos embrionados podem ser inoculados depositando as amostras virais diretamente na CAM, ou depositando-os no saco amniótico, alantóide ou da gema. A inoculação por via saco da gema tem favorecido a replicação dos vírus entéricos (KISARY et al., 1985; SENNE,

1998; McNULTY, 2003; ROSENBERGER, 2003; CAVANAGH; GELB, 2008; IMADA, 2008; REYNOLDS; SCHULTZ-CHERRY, 2008).

2.3 METODOLOGIAS DE IDENTIFICAÇÃO VIRAL

Uma série de técnicas foi desenvolvidas para a detecção de vírus e componentes virais, e muitas são usadas em laboratórios para o seu diagnóstico. As técnicas podem ser organizadas em quatro categorias: Detecção da infectividade viral; Detecção do vírus; Detecção de antígenos virais; e Detecção de ácidos nucléicos virais (VILLEGAS E LUKERT, 1998).

2.3.1 Detecção da infectividade viral

Os efeitos que os vírus produzem nos sistemas hospedeiros, nos quais eles são cultivados, é um bom indicador da presença do vírus e de sua infectividade. Os vírus que tem a capacidade de se replicar em um hospedeiro biológico são denominados infecciosos, e o termo infectividade é usado para denotar a capacidade que um vírus tem para se replicar. Muitos virions podem não ser infecciosos devido à falta de parte de seu genoma ou porque eles foram danificados. Para se determinar se uma amostra ou um espécime contém um vírus infeccioso, este deve ser inoculado em um sistema hospedeiro ou cultivo celular, e depois de um período de incubação sob condições apropriadas, ser examinado para se determinar os danos induzido pelo vírus (CARTER; SAUNDERS, 2007).

O crescimento dos vírus e sua infectividade nos ovos embrionados de galinha podem ser detectados na maioria das vezes pela observação das seguintes características: morte embrionária, lesões na membrana corioalantóide (CAM) como edema ou a formação de placas, lesões no embrião como nanismo, hemorragias cutâneas e desenvolvimento anormal de músculos e penas,

e anormalidades nos órgãos viscerais, descoloração esverdeada do fígado, focos necróticos sobre o fígado ou o coração e a formação de depósitos de urato nos rins. Métodos diretos e definitivos para a detecção da infecção viral nos embriões: capacidade do líquido amniótico alantóide causar hemaglutinação (HA) de eritrócitos e o uso de técnicas sorológicas e moleculares (SENNE, 1998).

2.3.2 Detecção do vírus

Na microscopia eletrônica, as amostras podem ser coradas negativamente e examinadas para a determinação da presença do vírus. Método de alto custo e de limitada sensibilidade. A concentração mínima detectável de um virion é de cerca de 10^6 /mL. Usada para a análise de amostras fecais provenientes de pacientes com doença entérica. Astrovírus de galinha, parvovírus aviário, coronavírus aviário, adenovírus aviário, rotavírus aviário e rotavírus aviário foram identificados e caracterizados pelo uso da microscopia eletrônica (IMADA; YAMAGUCHI; KAWAMURA, 1979; KISARI et al., 1985; KANG; NAGARAJA; NEWMAN, 1986; REYNOLDS; CAVANAGH, 2005; SCHULTZ-CHERRY 2008). A microscopia eletrônica foi uma das principais técnicas utilizadas na caracterização dos vírus relacionados com doença entérica, permitindo distinguir, principalmente o tamanho e a forma dos vírus (IMADA; YAMAGUCHI; KAWAMURA, 1979; KISARY; NAGY; BITAY, 1984; MAONDEZ; ARIAS, 2007; ADAIR; FITZGERALD, 2008; IMADA, 2008; REYNOLDS; SCHULTZ-CHERRY, 2008).

2.3.3 Detecção de antígenos virais

Os antígenos virais podem ser detectados através de anti-soros vírus específicos ou anticorpos monoclonais. Na maioria das técnicas os resultados positivos são detectados pela

presença de um marcador, que pode estar ligado a um anticorpo anti-vírus (testes diretos) ou a um segundo anticorpo (teste indireto). O principal método utilizado é o ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*), anticorpos para o reovírus aviário e o parvovírus das galinhas foram identificados usando esta técnica (VILLEGAS; LUKERT, 1998; STROTHER; ZSAK, 2009; XIE et al., 2011).

2.3.4 Detecção de ácidos nucléicos virais

A detecção dos ácidos nucléicos foi realizada pelo uso de técnicas moleculares.

2.3.4.1 Hibridização

Os vírus podem ser detectados através de seu ácido nucléico usando técnicas de hibridização onde o genoma viral, DNA ou RNA, podem ser detectados usando sondas de DNA com sequências específicas apropriadamente marcadas. Os marcadores usados para a detecção de anticorpos podem ser usados também como marcadores para as sondas. A hibridização pode ser realizada usando *Southern blotting* (DNA) ou *Northern blotting* (RNA). Assim, delgadas secções de tecidos podem ser analisadas para a presença de ácidos nucléicos específicos para um vírus (CARTER; SANDERS, 2007).

2.3.4.2 Reação em cadeia pela polimerase (PCR) e Técnica da transcriptase reversa da reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR)

Quando uma amostra contém uma quantidade mínima de ácidos nucleicos a probabilidade de detecção pode ser aumentada pela amplificação do DNA viral usando a PCR, enquanto que o RNA pode ser transformado em DNA e amplificado usando a RT-PCR. O procedimento requer *primers* com oligonucleotídeos específicos das sequências virais. Um produto amplificado pode ser detectado por eletroforese em um gel de agarose, usando um corante para DNA. Há também técnicas de PCR descritas como quantitativas porque consegue realizar a avaliação do número de moléculas produzidas a cada ciclo. O PCR em tempo real (real time PCR) é usado para este propósito. As características relevantes do PCR em tempo real são rapidez, especificidade, sensibilidade e quantificação. Nesta técnica o aumento da concentração de DNA durante o PCR é monitorado usando marcadores fluorescentes (CARTER; SAUNDERS, 2007).

Mediante o uso destas técnicas moleculares e o sequenciamento de DNA, a grande maioria dos vírus entéricos como adenovírus aviário, reovírus aviário, coronavírus aviário, astrovírus aviário foram caracterizados molecularmente, e está permitindo que o diagnóstico seja mais rápido, sensível e específico (BENAVENTE; MARTINEZ-COSTAS, 2007; DAY; SPACKMAN; PANTIN-JACKWOOD, 2007; PANTIN-JACKWOOD et al., 2007; PANTIN-JACKWOOD et al., 2008; ZSAK; STROTHER; DAY, 2009; BANYAI et al., 2010; JINDAL et al., 2010; SPACKMAN; DAY; PANTIN-JACKWOOD, 2010).

3 OBJETIVOS

1. Isolar, cultivar e propagar em ovos embrionados, livres de patógenos específicos (*SPF*), vírus relacionados com doença entérica em galinhas.
2. Estabelecer uma estratégia de isolamento, cultivo e propagação de vírus entéricos em ovos embrionados livres de patógenos específicos (*SPF*).
3. Caracterizar macroscopicamente as lesões que os vírus entéricos produzem nos embriões de galinha e determinar os padrões para cada um deles.
4. Confirmar o isolamento viral diagnosticando a presença e persistência destes vírus, através da detecção molecular destes vírus por meio da utilização do PCR e RT-PCR.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Descrição dos materiais utilizados, seu uso, processamento e as técnicas laboratoriais utilizadas no trabalho para a obtenção dos resultados.

4.1 ISOLAMENTO, CULTIVO E PROPAGAÇÃO DOS VÍRUS

Descrição do isolamento, cultivo e propagação de vírus entéricos em ovos embrionados de galinha livre de patógenos específicos.

4.1.1 Ovos Embrionados Livres de Patógenos Específicos (*SPF*)

Foram utilizados 1.680 ovos embrionados livres de patógenos específicos (*SPF*), com zero dia de incubação. A cada 30 dias foram recebidos 120 ovos, obtidos de um fornecedor certificado pelo Ministério de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo. Os ovos foram utilizados segundo a tabela 1.

Os ovos foram inspecionados para se garantir que não estivessem rachados, fissurados ou danificados pelo transporte. Dentre os ovos recebidos, 25% foram descartados (420 unidades), por danos no transporte, manejo ou falta de viabilidade durante a incubação.

Depois da seleção, os ovos foram divididos em bandejas com capacidade para 30 ovos, alojados em incubadoras automáticas, em temperatura que oscilava entre 38 a 38,6°C, com umidade entre 60 e 70 %, movimentação automática com intervalo de uma hora, para promover o crescimento e evitar a aderência de membranas embrionárias. As incubadoras permaneceram na sala de incubação de ovos embrionados do Laboratório de Ornitopatologia da FMVZ-USP.

Com os grupos 1 e 2 de ovos foram realizadas seis (06) passagens de amostras, pois nas passagens iniciais não ocorreram alterações embrionárias, na maioria das vezes os vírus não são detectados nas primeiras passagens e passagens adicionais podem ser necessárias, até a adaptação viral nos ovos. Com os grupos 3 e 4 de ovos foram realizadas apenas três (03) passagens, pois as amostras foram inoculadas em ovos de diferentes idades para se determinar qual seria a melhor para se conseguir o isolamento viral.

Para cada grupo de ovos foi usado um número diferente de amostras, uma vez que o número de ovos viáveis no momento da inoculação era um limitante, assim como, o volume da amostra recebida.

Tabela 1 - Número de ovos que foram usados nos ensaios experimentais

Grupo	Nº amostras inoculadas	Nº Controle Negativo	Nº Total de amostras Inoculadas	Nº de ovos por amostra	Total de ovos por passagem	Número de Passagens	Nº total de ovos
1	24	1	25	3	75	6	450
2	27	1	28	3	84	6	504
3	16	1	17	3	51	3	153
4	16	1	17	3	51	3	153
Total	83	4	87	12	261	18	1260

4.1.2 Vírus

Foram utilizadas amostras de fezes ou de intestinos de galinhas ou de frangos de corte, em um total de 83 amostras. Estas amostras foram enviadas ao Laboratório de Ornitopatologia da FMVZ-USP para o diagnóstico molecular de vírus entéricos e foram identificadas previamente mediante a utilização de RT-PCR ou PCR e Sequenciamento de DNA.

Estas amostras eram de aves com presença ou ausência de sinais clínicos de doença entérica (diarreia), de várias granjas localizadas em diferentes Estados brasileiros de produção avícola intensiva.

Foram utilizadas amostras positivas para os seguintes vírus:

- Astrovírus de Galinha (n=21)
- Vírus da Nefrite Aviária (n=20)
- Parvovírus de Galinha (n=17)
- Rotavírus Aviário (n=8)
- Reovírus Aviário (n=5)
- Adenovírus Aviário do Tipo 1 (n=4)
- Vírus da Bronquite Infecciosa das Galinhas (n=8)

As tabelas 2, 3, 4 e 5 mostram a origem das amostras usadas neste estudo.

Tabela 2 - Origem das amostras usadas no isolamento viral do grupo de ovos 1

N.	Número da Amostra Estocada no Labor	Tipo de Aves	Idade	Localidade	Sinais Clínicos		Tipo de Amostra	RT-PCR e PCR Diagnóstico LABOR
					Diarreia	Retardo do Crescimento		
1	348-2	FC	NI	NI	NI	NI	Fezes	BIG
2	356-5	FC	NI	NI	NI	NI	Fezes	BIG
3	356-6	FC	NI	NI	NI	NI	Fezes	BIG
4	370-6	R	NI	SP	NI	NI	Intestino	BIG
5	370-2	R	NI	SP	NI	NIR	Fezes	BIG
6	336-3	NI	NI	NI	Sim	Sim	Intestino	ChPV
7	336-19	NI	NIR	NI	Sim	Sim	Intestino	ChPV
8	369 - J	FC	8 dias	GO	Sim	Sim	Intestino	ChPV
9	182	NI	27 dias	NI	NI	Sim	Fezes	ANV
10	243	NI	52 dias	SP	Não	Não	Fezes	ANV
11	336-8	NI	NI	NI	Sim	Sim	Fezes	ANV
12	358-9	FC	10 dias	SC	Sim	Sim	Intestino	ANV
13	362-1	FC	3 dias	RS	Não	Sim	Intestino	ANV
14	365-2	P	53 dias	SP	Sim	Não	Fezes	ANV
15	6 EXP	NI	NI	NI	NI	NI	Fezes	CAstV
16	173	FC	30 dias	NI	NI	Sim	Fezes	CAstV
17	336-18	NI	8 dias	NI	Sim	Sim	Intestino	CAstV
18	359-1	M	1 dia	SC	Não	Não	Intestino	CAstV
19	359-2	M	1 dia	SC	Não	Não	Intestino	CAstV
20	369-G	FC	4 dias	GO	Sim	Sim	Intestino	CAstV
21	371-2	FC	22 dias	RS	Não	Sim	Fezes	CAstV
22	89	FC	22 dias	SC	Sim	Sim	Fezes	Rotavírus
23	365-5	P	87 dias	SP	Não	Não	Fezes	Rotavírus
24	8	FC	42 dias	PR	Sim	Não	Fezes	Reovírus
25	CONTROLE -							PBS

NI = Não Reportado; SP=São Paulo; GO=Goiás; PR=Pará; RS=Rio Grande do Sul; SC=Santa Catarina; M=Matriz; FC=Frango de Corte; P=Poedeira

Tabela 3 - Origem das amostras usadas no isolamento viral do grupo de ovos 2

N.	Número da Amostra Estocada no Labor	Tipo de Aves	Idade	Localidade	Sinais Clínicos		Tipo de Amostra	RT-PCR e PCR Diagnóstico LABOR
					Diarreia	Retardo do Crescimento		
26	164 ca	NI	25 dias	NI	NI	Sim	Fezes	BIG
27	174	NI	31 dias	NI	NI	Sim	Fezes	BIG
28	215	NI	NI	ES	NI	NI	Intestino	BIG
29	336-6	NI	NI	NI	Sim	Sim	Intestino	ChPV
30	372-1	FC	25 dias	RS	Não	Sim	Fezes	ChPV
31	358-1	FC	8 dias	SC	Não	Não	Intestino	ANV
32	358-2	FC	8 dias	SC	Não	Não	Intestino	ANV
33	358-8	FC	10 dias	SC	Não	Não	Intestino	ANV
34	358-9	FC	10 dias	SC	Sim	Sim	Intestino	ANV
35	372-2	FC	28 dias	RS	Não	Sim	Intestino	ANV
36	162	NI	40 dias	NI	Não	Sim	Fezes	ANV
37	358-2	FC	8 dias	SC	Não	Não	Intestino	CAstV
38	336-8	NI	NI	NI	Sim	Sim	Intestino	CAstV
39	336-18	NI	8 dias	NI	Sim	Sim	Intestino	CAstV
40	358-1	FC	8 dias	SC	Não	Não	Intestino	CAstV
41	9 A célula-1	NI	NI	NI	NI	NI	Fezes	Rotavírus
42	9 A célula-2	NI	NI	NI	NI	NI	Fezes	Rotavírus
43	9 fezes	FC	43 dias	PR	Sim	Não	Fezes	Rotavírus
44	S/N células-1	NI	NI	NI	NI	NI	Fezes	Rotavírus
45	7 D células	NI	NI	NI	NI	NI	Fezes	Rotavírus
46	S/N células-2	NI	NI	NI	NI	NI	Fezes	Rotavírus
47	Células Totais	NI	NI	NI	NI	NI	Fezes	Reovírus
48	Células Parciais	NI	NI	NI	NI	NI	Fezes	Reovírus
49	163 ca	NI	35 dias	NI	NI	Sim	Fezes	Reovírus
50	163	NI	35 dias	NI	NI	Sim	Fezes	Reovírus
51	334-6 Int.	NI	33 Sem.	SP	Não	Não	Intestino	FAdV-1
52	334-5 Int. F R	NI	33 Sem.	SP	Não	Não	Intestino	FAdV-1
53	CONTROLE -							PBS

NR = Não Reportado; SP=São Paulo; GO=Goiás; PR=Pará; RS=Rio Grande do Sul; SC=Santa Catarina; M=Matriz; FC=Frango de Corte; P=Poedeira

Tabela 4 - Origem das amostras usadas no isolamento viral do grupo de ovos 3 e 4

N.	Número da Amostra Estocada no Labor	Tipo de Aves	Idade	Localidade	Sinais Clínicos		Tipo de Amostra	RT-PCR e PCR Diagnóstico LABOR
					Diarreia	Retardo do Crescimento		
54	400-6	FC	21 dias	SP	Sim	Sim	Intestino	ANV
55	400-3	FC	14 dias	SP	Sim	Sim	Intestino	ANV
56	400-2	FC	7 dias	SP	Sim	Sim	Intestino	ANV
57	354-6	FC	29 dias	SC	Sim	Sim	Intestino	ANV
58	362-3 (astro)	FC	7 dias	RS	Não	Sim	Intestino	CAstV
59	359-2 int	M	1 dia	SC	Não	Não	Intestino	CAstV
60	358-2 astro	FC	8 dias	SC	Não	Não	Intestino	ANV
61	365-5 int	P	87 dias	SP	Não	Não	Fezes	ChPV
62	336-6	NI	NI	NI	Sim	Sim	Intestino	ChPV
63	362-5 astro	FC	14 dias	RS	Não	Sim	Intestino	CAstV
64	336-18 astro	NI	8 dias	NI	Sim	Sim	Intestino	CAstV
65	336-18	NI	8 dias	NI	Sim	Sim	Intestino	CAstV
66	336-6 PARVO -	NI	NI	NI	Sim	Sim	Intestino	ChPV
67	336-6 PA VO	NI	NI	NI	Sim	Sim	Intestino	ChPV
68	400-8B rim	FC	28 dias	SP	Sim	Sim	Rins	ChPV
69	102 Diag	NI	NI	NI	NI	NI	Fezes	FAdV-1
70	CONTROLE -							PBS

NI = Não Reportado; SP=São Paulo; GO=Goiás; PR=Pará; RS=Rio Grande do Sul; SC=Santa Catarina; M=Matriz; FC=Frango de Corte; P=Poedeira

4.1.3 Inoculo

Durante a realização do experimento foram utilizadas duas formas de preparo do inoculo para a infecção dos ovos embrionados.

4.1.3.1 Preparo do inoculo para os grupos de ovos 1 e 2

Para os grupos de ovos 1 e 2 o inoculo foi realizado utilizando uma alíquota das amostras, previamente maceradas e armazenadas a -20°C . As amostras foram colocadas em microtubos contendo PBS 0,1M, pH 7,4, foram homogeneizadas e submetidas a três ciclos de congelamento e descongelamento, ou seja, foram congeladas a -20°C por 10 minutos, submetidas a 56°C por 1 minuto. A cada ciclo foram homogeneizadas em *vortex* por 20 segundos. Após este procedimento foram centrifugadas a $12.000\text{ g} \times 20$ minutos a 4°C . A amostra foi diluída em PBS 0,1M, pH 7,4, na proporção de 1:7, sendo o volume final de $1300\text{ }\mu\text{L}$, a esta se acrescentou $10\text{ }\mu\text{L}$ de antibiótico (penicilina 10.000 IU/mL e sulfato de estreptomicina 2 mg/mL) e $10\text{ }\mu\text{L}$ de antifúngico (anfotericina B $0,02\text{ mg/mL}$). A inoculação foi realizada no sétimo dia de incubação dos ovos, pela via do saco da gema como mostra a tabela 3. O grupo controle negativo recebeu o mesmo volume de PBS 0,1M, pH 7,4, estéril.

A ausência de amostras positivas para astrovírus de galinha, parvovírus de galinha e rotavírus aviário na reação de PCR ou RT-PCR nos grupos 1 e 2 de ovos embrionados, determinou que a forma de elaboração do inóculo deveria ser modificada para a infecção nos grupos de ovos 3 e 4.

4.1.3.2 Preparo do inóculo para os grupos de ovos 3 e 4

Para os grupos de ovos 3 e 4 o inóculo foi realizado usando as suspensões das amostras utilizadas na detecção molecular. Ao microtubo que continha a suspensão da amostra positiva ao vírus se acrescentou 450 μ L de PBS 0,1M, pH 7,4 e esta foi homogeneizada no *vortex* até que se misturasse completamente. Após este procedimento foram centrifugadas a 12.000 g x 20 minutos a 4°C. A amostra foi diluída na proporção 1:7, sendo o volume final 1300 μ L. A concentração e o volume de antimicrobianos foi a mesma descrita no 4.1.3.1. Assim como a forma de inoculação.

4.1.4 Delineamento Experimental

A partir do dia do recebimento dos ovos, se iniciou a incubação dos mesmos. No quinto dia de incubação, foi usado um ovoscópio para a visualização de cada ovo, descartando-se os ovos não viáveis (mortos). No sétimo dia de incubação foi reconfirmada a viabilidade dos ovos e marcado o sítio de inoculação usando um X, após este procedimento os ovos vivos foram identificados, colocando o número da amostra e a passagem. Na capela de fluxo laminar, os ovos foram desinfetados com álcool 70%, aplicado por aspersão e o sítio marcado foi perfurado usando uma agulha 21x7 previamente desinfetada com álcool 70%. O saco da gema recebeu 0,2 mL do inóculo. Cada amostra foi inoculada em três ovos, que foram selados e colocados novamente na incubadora.

Nos três primeiros grupos foram realizadas inoculações com sete (07) dias de idade, ou seja, quando se inicia a formação e diferenciação dos intestinos no embrião e no grupo 4 a inoculação ocorreu com 14 dias de idade do embrião, no momento em que os intestinos estão mais desenvolvidos e funcionais. A viabilidade dos embriões foi acompanhada diariamente por cinco dias.

Os embriões que morreram em 24 horas após a inoculação foram descartados porque foram considerados embriões com morte não específica, podendo ocorrer devido a danos

provocados no momento da inoculação ou por contaminação bacteriana. Aqueles que morreram após as primeiras 24 horas foram retirados da incubadora e foram mantidos a 4°C até o momento da necropsia, para se evitar perdas na concentração viral, processo que não alteraria as características morfológicas do embrião ou aquelas produzidas pelo vírus inoculado. Os ovos inoculados no sétimo dia de idade e que permaneceram vivos até o quinto dia da infecção foram sacrificados. Os ovos foram colocados a 4°C por 18 horas para se assegurar a morte do embrião por hipotermia e coagulação do sangue, evitando-se assim que os eritrócitos produzissem perdas e alteração no título viral. Os ovos inoculados no décimo quarto dia foram sacrificados por decapitação para se evitar o sofrimento dos embriões e respeitando as Normas de Bioética e Bem-Estar Animal, recomendadas pelo NRC (2002). As amostras foram submetidas a três (03) ou seis (06) passagens dependendo da presença ou ausência do vírus.

Os ovos que morreram na incubação e os que foram eutanasiados foram necropsiados, sendo recolhido o embrião e a gema. A cabeça, as asas e as patas foram retiradas antes da maceração do embrião. O material colhido foi utilizado para a realização do inoculo para a próxima passagem nos ovos.

Uma alíquota das amostras, após a maceração (embrião e gema), foi colocada em microtubos contendo PBS 0,1M, pH 7,4, homogeneizadas e submetidas a três ciclos de congelamento e descongelamento. Os demais procedimentos foram realizados de acordo com a descrição no item 4.1.3.1. O volume de 0,2 mL da amostra do embrião macerado foi inoculado nos ovos.

4.2 CARACTERIZAÇÃO MACROSCÓPICA

Foram realizadas as necrópsias dos ovos após a eutanásia. Os embriões foram analisados quanto às alterações macroscópicas desenvolvidas como deformidades, nanismo e enrolamento, assim como, a presença de hemorragias, edemas, aspecto gelatinoso.

As lesões macroscópicas foram avaliadas qualitativamente determinando a presença (positivo) ou ausência (negativo) de lesões.

4.3 CONFIRMAÇÃO DO ISOLAMENTO VIRAL

A confirmação do isolamento viral foi realizada pela detecção de ácidos nucleicos virais usando as técnicas moleculares de PCR e RT-PCR. Os embriões que se apresentaram positivos pelas técnicas moleculares foram considerados amostras com o vírus isolado, mesmo naqueles onde apenas uma passagem tivesse sido realizada.

4.3.1 Amostragem, conservação e processamento de amostras para testes moleculares

Os resultados positivos nas reações de RT-PCR ou PCR foram utilizados para se determinar a frequência de tentativa de isolamento viral nos ovos que estavam relacionados com as lesões e alterações nos tecidos embrionários. Foram coletados separadamente o embrião e a gema. Após a maceração, as amostras foram colocadas em tubos de ensaio de 15 mL, de plástico, estéreis e armazenados a - 20°C até a sua utilização.

4.3.2 Maceração

A primeira etapa que foi realizada nos testes moleculares foi a maceração do embrião. Para a maceração, as amostras (embriões) foram cortadas em fragmentos pequenos e em seguida homogeneizadas.

4.3.3 Suspensão Viral

Uma alíquota das amostras, após a maceração (embrião e gema), foi colocada em microtubos contendo PBS 0,1M, pH 7,4. O material restante foi armazenado a -20° C. As amostras nos microtubos foram congeladas a -20°C por 10 minutos, submetidas a 56°C por 1 minuto para seu descongelamento e homogeneizadas em *vortex* por 20 segundos, este procedimento se repetiu por três vezes. As amostras foram centrifugadas a 12.000 x g x 20 minutos a 4°C para os vírus DNA e a 12.000 x g x 30 minutos a 4°C para os vírus RNA.

4.3.4 Extração do RNA viral.

Para a extração de RNA das amostras se utilizou o reagente *Brazol* (LGC), e as instruções do fabricante: Em microtubo livre de DNase ou RNase se adicionou 750 µL de *Brazol* para 250 µL de suspensão de amostra, sendo este mantido em temperatura ambiente por cinco (5) minutos. Em seguida, se adicionou 150 µL de clorofórmio (Merck), as amostras foram homogeneizadas com as mãos e foram incubadas em temperatura ambiente por 15 minutos. Depois da incubação, as amostras foram centrifugadas a 12.000 x g x 15 minutos a 4°C. O sobrenadante que continham o RNA isolado foi transferido para um microtubo novo, adicionado de 500 µL de isopropanol (Merck). A amostra foi incubada em temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugada a 12.000 x g x 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado, e ao *pellet* se acrescentou 750 µL de etanol 75% gelado, sendo centrifugada a 12.000 x g x 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e se deixou secar o *pellet* virando o microtubo em papel absorvente por 10 minutos. Em seguida, o RNA foi dissolvido em 20 µL de DPEC (Invitrogen) e os microtubos foram incubados em placa a 56°C por 10 minutos. A amostra foi armazenada a -20°C.

4.3.5 Técnica da Transcriptase Reversa da Reação em Cadeia pela Polimerase (RT-PCR)

O RNA extraído foi submetido a uma reação de transcrição reversa (RT), para a obtenção do DNA complementar (cDNA). O cDNA foi utilizado, para a detecção de um fragmento de gene específico de cada vírus. Foram utilizados 3,5 µL de RNA extraído para 6,5 µL de *mix* de reação que continha 2 µL de tampão 10X, 1 µL de deoxinucleotídeo trifosfato (dNTPs) 10 mM, 1 µL de DTT, 0,5 µL de enzima M-MLV (Invitrogen) e 1 µL de cada um dos *primers* senso e antisenso. O RNA extraído (3,5 µL) foi desnaturado a uma temperatura de 94°C por 5 minutos, e incluídos ao *mix* da reação. A reação de transcrição reversa ocorreu nas seguintes condições: 45°C por 60 minutos e 72°C por 10 minutos. O cDNA obtido foi submetido a uma reação de PCR. Na reação de PCR se utilizou 22,5 – 24 µL de *mix* de reação que continha: uma quantidade de cada um dos *primers* Senso e Antisenso, 5 µL de tampão 5X, 4 µL de dNTPs 1,25 mM, 0,75-2 µL de MgCl₂ 50mM e 1 U de DNA Polimerase (Platinum, Invitrogen) e 1 – 2,5 µL de cDNA. A reação de amplificação ocorreu nas seguintes condições: um ciclo térmico de 94°C por 3 minutos para desnaturar completamente o cDNA, 30 ciclos de temperaturas de desnaturação a 94°C por um minuto, hibridização dos *primers* a 50°C por um minuto, 72°C por um minuto para a extensão, seguida de incubação final a 72°C, por 10 minutos. A reação foi mantida a 4°C ao infinito, até se armazenar os produtos amplificados a -20°C. A reação de RT-PCR e a reação de amplificação ocorreram segundo os protocolos descritos por outros autores como se mostra na tabela 5.

Tabela 5 - Tamanho dos produtos amplificados dos genes dos vírus RNA que foram estudados e referências

Vírus	Técnica Molecular	(pb)	Referência
Astrovírus de Galinha	RT-PCR	362	DAY; SPACKMAN; PANTIN, 2007
Vírus da Nefrite Aviária	RT-PCR	473	DAY; SPACKMAN; PANTIN, 2007
Vírus da Bronquite Infecciosa das Galinhas	RT-PCR - NESTED	179	CAVANAGH et al, 2002
Reovírus Aviário	RT-PCR	1120	PANTIN-JACKWOOD, 2007
Rotavírus Aviário	RT-PCR	630	PANTIN-JACKWOOD, 2007

O produto amplificado (362 pb Astrovírus de Galinha, 473 pb Vírus da Nefrite Aviária, 179 pb Vírus da Bronquite Infecciosa das Galinhas, 630 pb Rotavírus Aviário e 1120 pb Reovírus Aviário) foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,5%. As amostras foram coradas com *Sybr Safe* (Invitrogen) ou *BLue Green* (LGC). Foi utilizado o marcador de peso molecular de 100 pb. O resultado foi analisado por meio de um transluminador e foto documentado por *Alpha Imager Mini Análises System* (Alpha Innotech).

4.3.6 Extração do DNA viral.

Para a extração de DNA das amostras para a detecção de Parvovírus de Galinha e do Adenovírus Aviário do Tipo 1 foi utilizado o reagente *Brazol* (LGC) e as instruções do fabricante: Em microtubo livre de DNase ou RNase, adicionou-se 750 µL de *Brazol* para 250 µL de suspensão de amostra, sendo a amostra incubada por 5 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, se adicionou 150 µL de clorofórmio (Merck), as amostras foram homogeneizadas com as mãos e foram incubadas em temperatura ambiente por 15 minutos. Depois da incubação, as amostras foram centrifugadas a 12.000 x g x 15 minutos a 4°C. O

sobrenadante que continha o RNA isolado foi removido e o DNA da interfase e da fase orgânica foi precipitado com 250 μL de etanol 100% (Merck), a amostra foi homogeneizada por inversão (com as mãos). As amostras foram incubadas em temperatura ambiente por 3 minutos e centrifugadas a 2000 x g x 5 minutos a 4°C. Imediatamente após a centrifugação, se removeu o sobrenadante de fenol e etanol, homogeneizou-se o *pellet* de DNA com 750 μL de solução de etanol 10% contendo citrato de sódio 0,1 M e se incubou por 30 minutos em temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas a 2000 x g x 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi removido, 750 μL de solução de etanol 10% contendo citrato de sódio 0,1 M foi adicionado, a amostra foi incubada e centrifugada nas mesmas condições já descritas. O *pellet* de DNA foi ressuspenso em 1125 μL de etanol 75%, e foi mantido em temperatura ambiente por 10 a 20 minutos com homogeneizações periódicas. A amostra foi centrifugada a 2000 x g x 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi seco virando os tubos em papel absorvente por 10 minutos. Dissolveu-se o DNA em 30 μL de NaOH 8M ou TE e se incubou em placa a 56°C por 10 minutos. Armazenou-se a -20°C até o uso.

4.3.7 Reação em Cadeia pela Polimerase – PCR

A reação de PCR ocorreu com 22,5-23 μL de *mix* de reação, que continha 10 pmol de cada um dos *primers* Senso e Antisenso, 5 μL de tampão 5X, 4 μL de dNTP 1,25mM, 0,75-2 μL de MgCl_2 50mM e 1 U de DNA polimerase (Platinum, Invitrogen) e 2 – 2,5 μL de DNA extraído. A reação de amplificação ocorreu nas seguintes condições: um ciclo térmico de 94°C por 3 minutos para desnaturar completamente o DNA, 30 ciclos de temperaturas de desnaturação a 94°C por um minuto, hibridização dos *primers* a 50°C por um minuto, 72°C por um minuto para a extensão, seguida de incubação final a 72°C, por 10 minutos. A reação foi mantida a 4°C ao infinito, até se armazenar os produtos amplificados a -20°C. A reação de PCR e a reação de amplificação ocorreram segundo os protocolos descritos por outros autores como se mostra na tabela 6.

Tabela 6 - Tamanho dos produtos amplificados dos genes dos vírus DNA que foram estudados e referências

Vírus	Técnica Molecular	(pb)	Referencia
Parvovírus de Galinha	PCR	561	ZSAK; STROTHER; DAY, 2009
Adenovírus Aviário Tipo 1	PCR	879	ALVARADO et al., 2007

O produto amplificado (561 pb Parvovírus de Galinha e 879 pb Adenovírus Aviário do Tipo 1) foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,5%. As amostras foram coradas com *Sybr Safe* (Invitrogen) ou *BLue Green* (LGC). Foi utilizado o marcador de peso molecular de 100 pb. O resultado foi analisado por meio de um transluminador e foto documentado por *Alpha Imager Mini Análises System* (Alpha Innotech).

4.3.8 Diagnóstico Diferencial

Foi realizado o diagnóstico diferencial para a doença de Newcastle das amostras em estudo usando a técnica da reação em cadeia pela polimerase (PCR). A reação de PCR e a reação de amplificação ocorreram segundo os protocolos descritos por CHACON (2005).

4.3.9 Primers

Sequências de *Primers* previamente publicadas foram utilizadas para a realização da RT-PCR e PCR para se detectar os vírus selecionados neste estudo e que se encontram na tabela 7.

Tabela 7 - *Primers*, sequência de nucleotídeos, produto amplificado (pb), referências dos vírus entéricos que foram estudados e referencia do vírus usado no diagnostico diferencial

Vírus	Primer	Sequência de nucleotídeos (5` - 3`)	(pb)	Referência
Parvovírus de Galinha	PVF1 PVR1	TTCTAATAACGATATCACT TTTGCGCTTGCGGTGAAGTCTGGCTCG	561	ZSAK; STROTHER; DAY, 2009
Astrovírus de Galinha	CASpol 1F CASpol 1R	GAYCARCGAATGCGRAGRTTG TCAGTGGAAGTGGGKARTCTAC	362	DAY; SPACKMAN; PANTIN, 2007
Vírus da Nefrite Aviária	ANV Pol 1F ANV Pol 1R	GYTGGGCGCYTCYTTTGAYAC CRTTGGCCCKRTARTCTTTT	473	DAY; SPACKMAN; PANTIN, 2007
Adenovírus Aviário Tipo 1	Hexon A Hexon B	CAARTTCAGRCAGACGGT TAGTGATGMC GSGACATCAT	879	ALVARADO et al., 2007
Vírus da Bronquite Infecciosa das Galinhas	UTR 11 UTR 44 UTR 31	ATGTCTATCGCCAGGGAAATGTC GGGCGTCCAAGTGCTGTACCC GCTCTAACTCTATACTAGCCTA	179	CAVANAGH et al, 2002
Reovírus Aviário	S4-F13 S4-R1133	GTGCGTGTTGGAGTTTCCCG TACGCCATCCTAGCTGGA	1120	PANTIN-JACKWOOD, 2007
Rotavírus Aviário	NSP4-F30 NSP4-R660	GTGCGGAAAGATGGAGAAC GTTGGGGTACCAGGGATTAA	630	PANTIN-JACKWOOD, 2007
Vírus da Doença de Newcastle	NEWS NEWA	GGAGGATGTTGGCAGCATT GTCAACATATACACCTCATC	324	CHACON, 2005

Y^A = pirimidina R^B = purina K^C

5 RESULTADOS

Neste capítulo serão descritos os resultados obtidos ao longo da realização deste trabalho.

5.1 DETECÇÃO E CONFIRMAÇÃO DO ISOLAMENTO, CULTIVO E PROPAGAÇÃO EM OVOS EMBRIONADOS *SPF* DE VÍRUS RELACIONADOS COM DOENÇA ENTÉRICA EM AVES

A confirmação do isolamento viral foi realizada pela utilização do PCR e RT-PCR. Todas as amostras foram testadas para astrovírus de galinha, parvovírus de galinha, vírus da nefrite aviária, vírus da bronquite infecciosa das galinhas, adenovírus aviário do tipo 1, rotavírus aviário, reovírus aviário e vírus da doença de Newcastle.

Astrovírus de galinha (*CAsV*) e parvovírus de galinha (*ChPV*) foram isolados e se propagaram em ovos embrionados *SPF* de sete ou quatorze dias de idade. Ocorreram alterações significativas depois de uma passagem em embriões com sete (07) dias de idade, mas naqueles com 14 dias de idade não havia nenhuma alteração no embrião.

Houve o isolamento e a propagação do vírus da nefrite aviária (*ANV*) e adenovírus aviário do tipo 1 (*FAdV-1*) em ovos embrionados *SPF* de sete ou quatorze dias de idade. Os embriões com sete (07) dias de idade apresentavam alterações significativas depois de uma passagem e se mantiveram depois de três ou seis passagens. Não se encontrou nenhuma alteração nos embriões com 14 dias de idade.

O vírus da bronquite infecciosa das galinhas (*BIG*) e reovírus aviário foram isolados e se propagaram em ovos embrionados *SPF* de sete dias de idade. Os vírus foram isolados depois de três ou seis passagens produzindo alterações significativas no embrião aos sete (07) dias de idade.

Rotavírus aviário não foi isolado em ovos embrionados *SPF* de sete dias de idade.

Nos ovos do grupo 2 ocorreram alterações que correspondiam àquelas descritas para o vírus Newcastle. Estas amostras foram analisadas para a presença deste vírus e esta foi confirmada. Em várias amostras o vírus foi detectado unicamente em uma passagem assim, nesta amostra e nesta passagem o vírus foi isolado, cultivado e propagado. Em outras amostras o vírus foi detectado em várias passagens sucessivas, confirmando seu isolamento, cultivo e propagação.

5.1.1 Detecção e Confirmação do isolamento viral do Grupo de ovos 1

No grupo de ovos 1 foram isolados o vírus da bronquite infecciosa das galinhas, vírus da nefrite aviária e reovírus aviário. Astrovírus de galinha, parvovírus de galinha, rotavírus aviário, adenovírus aviário não foram detectados neste grupo de ovos. Dezesete (17) e quinze (15) amostras foram negativas, respectivamente, na terceira passagem e na sexta passagem.

Vírus da Bronquite Infecciosa das Galinhas (BIG)

Neste grupo foram isoladas seis (06) amostras puras, quatro isoladas tanto na terceira como na sexta passagem e duas amostras isoladas na sexta passagem. Destas amostras três foram isoladas em amostras onde inicialmente este vírus não havia sido detectado.

Vírus da Nefrite Aviária (ANV)

Foram isoladas quatro (04) amostras puras para ANV, duas isoladas na terceira e na sexta passagem. Das outras duas amostras uma foi isolada na terceira e a outra na sexta passagem.

Reovírus Aviário

Foi isolada uma amostra pura para reovírus aviário na terceira passagem. Em uma amostra, na sexta passagem, foram isolados reovírus aviário e ANV.

O número da amostra inoculada, o vírus inoculado, o vírus isolado e a passagem na qual o vírus foi detectado nas amostras do grupo 1 se apresentam na tabela 8. A tabela 9 e as figuras 1 e 2 mostram o número de amostras positivas para os vírus estudados.

Tabela 8 - Vírus presente na amostra inoculada, passagem, e o vírus detectado por RT-PCR e PCR no grupo de ovos 1

N.	Número de Amostra	Vírus Inoculado	RT-PCR e PCR das Passagens em Ovos Embrionados Livres de Patógenos Específicos	
			Amostras Isoladas 3ª Passagem	Amostras Isoladas 6ª Passagem
1	348-2	BIG	-	-
2	356-5	BIG	BIG	BIG
3	356-6	BIG	BIG	BIG
4	370-6	BIG	BIG	BIG
5	370-2	BIG	-	-
6	336-3	ChPV	ANV	ANV + Reovírus Aviário
7	336-19	ChPV	-	-
8	369-J	ChPV	BIG	BIG
9	182	ANV	ANV	ANV
10	243	ANV	-	ANV
11	336-8	ANV	-	-
12	358-9	ANV	ANV	ANV
13	362-1	ANV	-	-
14	365-2	ANV	-	-
15	6 EXP	CAstV	-	-
16	173	CAstV	-	-
17	336-18	CAstV	Reovírus Aviário	-
18	359-1	CAstV	-	-
19	359-2	CAstV	-	-
20	369-G	CAstV	-	-
21	371-2	CAstV	-	-
22	89	Rota	-	BIG
23	365-5	Rota	-	-
24	8	Reo	-	BIG
25	Controle -	PBS	-	-

Tabela 9 - Número de amostras RT-PCR e PCR positivas e negativas para cada vírus estudado, no grupo de ovos 1

Vírus Detectado	Amostras Isoladas 3ª Passagem	Amostras Isoladas 6ª Passagem
CAstV	0	0
ANV	3	3
ChPV	0	0
BIG	4	6
Reovírus Aviário	1	0
Rotavírus Aviário	0	0
FAdV-1	0	0
ANV + Reovírus Aviário	0	1
Negativas	17	15
TOTAL	25	25

Figura 1- Número de amostras virais isoladas no grupo de ovos 1, nas seis passagens realizadas

Figura 2 - Amostras RT-PCR e PCR positivas e negativas na terceira e sexta passagem do grupo de ovos 1

5.1.2 Detecção e Confirmação do isolamento viral no grupo de ovos 2

No segundo grupo de ovos foram isolados adenovírus aviário do tipo 1 e reovírus aviário.

Não houve isolamento de astrovírus de galinha, parvovírus de galinha e rotavírus aviário.

Apresentaram-se amostras negativas para os vírus em estudo, onze (11) amostras na terceira passagem e dez (10) amostras na sexta passagem.

Adenovírus Aviário do Tipo (*FAdV-1*)

Foram isoladas nove (09) amostras para adenovírus aviário do tipo 1, todas na terceira passagem e somente uma delas pertencia ao vírus inoculado.

Reovírus Aviário

Foram isoladas duas (02) amostras para reovírus aviário na sexta passagem, porém em duas amostras onde inicialmente este vírus não havia sido detectado.

Neste grupo de ovos foi encontrada a presença do vírus da doença de Newcastle (NDV), isolado em várias amostras tanto na terceira como na sexta passagem. Combinações do NDV e outros vírus foram obtidas, ou seja, em uma amostra havia a presença de reovírus aviário e NDV, uma amostra apresentava BIG e NDV e nove (09) amostras possuíam FAdV-1 e NDV.

Vírus da Doença de Newcastle (NDV)

O NDV foi isolado em 11 amostras.

O número da amostra inoculada, o vírus inoculado, o vírus isolado e a passagem onde o vírus foi detectado nas amostras do grupo 2 se apresentam na tabela 10. A tabela 11 e a figura 3 e 4 mostram o número de amostras positivas para os vírus estudados.

Tabela 10 - Vírus presente na amostra inoculada, passagem, eo vírus detectado por RT-PCR e PCR no grupo de ovos 2

N.	Número de Amostra	Vírus Inoculado	RT-PCR e PCR das Passagens em Ovos Embrionados Livres de Patógenos Específicos	
			Amostras Isoladas 3ª Passagem	Amostras Isoladas 6ª Passagem
26	164 ca	BIG	-	-
27	174	BIG	-	-
28	215	BIG	-	-
29	336-6	ChPV	FadV-1 + NDV	NDV
30	372-1	ChPV	FadV-1 + NDV	NDV
31	358-1	ANV	FadV-1 + NDV	-
32	358-2	ANV	FadV-1 + NDV	-
33	358-8	ANV	FadV-1 + NDV	NDV
34	358-9	ANV	FadV-1	ANV + NDV
35	372-2	ANV	FadV-1 + NDV	ANV + NDV
36	162	ANV	-	NDV
37	358-2	CAstV	FadV-1	-
38	336-8	CAstV	NDV	NDV
39	336-18	CAstV	NDV	Reovírus Aviário
40	358-1	CAstV	FadV-1	NDV
41	9 A célula-1	Rota	-	-
42	9 A célula-2	Rota	FadV-1	NDV
43	9 fezes	Rota	FadV-1	FadV-1 + NDV
44	S/N células-1	Rota	-	-
45	7 D células	Rota	FadV-1	-
46	S/N células-2	Rota	FadV-1	FadV-1 + NDV
47	Total cells	Reo	FadV-1	Reovírus Aviário + NDV
48	Parcial célls	Reo	-	NDV
49	163 ca	Reo	-	NDV
50	163	Reovírus Aviário	-	NDV
51	334-6 Intestin	FAdV 1	FadV-1	Reovírus Aviário
52	334-5 Int. F R	FAdV 1	-	BIG + NDV
53	CONTROLE -	PBS	-	-

Tabela 11 - Número de amostras RT-PCR e PCR positivas e negativas para os vírus estudados no grupo de ovos 2

Vírus Identificado	Amostras Isoladas 3ª Passagem	Amostras Isoladas 6ª Passagem
CAstV	0	0
ANV	0	0
ChPV	0	0
BIG	0	0
Reovírus Aviário	0	2
Rotavírus Aviário	0	0
FAdV-1	9	0
ANV + NDV	0	2
FAdV-1 + NDV	6	2
BIG + NDV	0	1
Reovírus Aviário + NDV	0	1
NDV	2	10
Negativas	11	10
TOTAL	28	28

Figura 3- Número de amostras virais isoladas no grupo de ovos 2 nas seis passagens realizadas

Figura 4 - Amostras RT-PCR e PCR positivas e negativas na terceira e sexta passagem do grupo de ovos 2

5.1.3 Detecção e Confirmação do isolamento viral no grupo de ovos 3

No grupo de ovos 3 foram isolados astrovírus de galinha, parvovírus de galinha, vírus da nefrite aviária e adenovírus aviário do tipo 1. Rotavírus aviário e reovírus aviário, não foram detectados neste grupo de ovos. Neste grupo de ovos não houve isolamento viral em doze (12) amostras na primeira passagem, nove (9) amostras na segunda passagem e em nove (9) na terceira passagem.

Astrovírus de galinha (*CAstV*).

Foram isoladas três (03) amostras puras para astrovírus de galinha, duas isoladas na primeira passagem e uma isolada na primeira, segunda e terceira passagem.

Vírus da Nefrite Aviária (*ANV*)

Foram isoladas oito (08) amostras puras para o vírus da nefrite aviária, quatro isoladas na segunda e terceira passagem, três amostras somente na terceira passagem e uma amostra na segunda passagem.

Parvovírus de Galinha (*ChPV*)

Foi isolada uma amostra pura para parvovírus de galinha na primeira passagem.

Vírus da Bronquite Infecciosa das Galinhas (*BIG*)

O vírus da bronquite infecciosa das galinhas foi isolado em uma amostra na terceira passagem.

Adenovírus Aviário do Tipo (*FAdV-1*)

Foi isolada uma amostra para adenovírus aviário do tipo 1 na segunda passagem. Em uma amostra foi isolado uma combinação de astrovírus de galinha e parvovírus de galinha.

As amostras foram isoladas na primeira, segunda e terceira passagem nos ovos embrionados de galinha *SPF*, como se apresenta na tabela 12. O número da amostra inoculada, o vírus inoculado, o vírus isolado e a passagem onde o vírus foi detectado nas amostras do grupo 3 se apresentam na tabela 12. O número de amostras isoladas para cada vírus estudados é apresentado na tabela 13 e nas figuras 5 e 6.

Tabela 12 - Vírus presente na amostra inoculada, passagem, e o vírus detectado por RT-PCR e PCR no grupo de ovos 3

N.	Número de Amostra	RT-PCR e PRC Diagnóstico LABOR	RT-PCR e PCR para Reconfirmação de Positividade	RT-PCR e PCR das Passagens em Ovos Embrionados Livres de Patógenos Específicos		
				Amostras Isoladas 1ª Passagem	Amostras Isoladas 2ª Passagem	Amostras Isoladas 3ª Passagem
54	400-6	ANV	ANV	-	ANV	ANV
55	400-3	ANV	ANV	-	-	-
56	400-2	ANV	ANV	-	ANV	ANV
57	354-6	ANV	ANV	-	-	-
58	362-3 (astro)	CAstV	ANV	ChPV	ANV	ANV
59	359-2 int	CAstV	CAstV	CAstV	-	-
60	358-2 astro	ANV	CAstV	CAstV	CAstV	CAstV
61	365-5 int	ChPV	CAstV + ChPV	-	-	ANV
62	336-6	ChPV	CAstV + ANV	-	-	ANV
63	362-5 astro	CAstV	CAstV + ANV + ChPV	CAstV + ChPV	ANV	ANV
64	336-18 astro	CAstV	CAstV + ANV	-	ANV	-
65	336-18	CAstV	CAstV + ANV	CAstV	-	BIG
66	336-6 PARVO -	ChPV	ChPV ANV + BIG	-	ANV	-
67	336-6 PA VO	ChPV	ChPV ANV + BIG	-	-	-
68	400-8B rim	ChPV	Negativo	-	-	-
69	102 Diag	FAdV-1	FAdV-1	-	FadV-1	-
70	CONTROLE -	PBS		-	-	-

Tabela 13 - Número de amostras RT-PCR e PCR positivas e negativas para cada vírus estudado no grupo de ovos 3

Vírus Identificado	Amostras Isoladas 1ª Passagem	Amostras Isoladas 2ª Passagem	Amostras Isoladas 3ª Passagem
CAstV	3	1	1
ANV	0	6	6
ChPV	1	0	0
BIG	0	0	1
Reovírus Aviário	0	0	0
Rotavírus Aviário	0	0	0
FAdV-1	0	1	0
CAstV + ChPV	1	0	0
Negativas	12	9	9
TOTAL	17	17	17

Figura 5- Número de amostras virais isoladas no grupo de ovos 3 nas três passagens realizadas

Figura 6 - Amostras RT-PCR e PCR positivas e negativas na terceira e sexta passagem do grupo de ovos 3

5.1.4 Detecção e Confirmação do isolamento viral no grupo de ovos 4

No grupo de ovos 4 foram isolados o astrovírus de galinha, parvovírus de galinha, vírus da nefrite aviária, e adenovírus aviário do tipo 1. Neste grupo também ocorreram combinações entre vírus, em três amostras havia a presença de CAsV e ANV, uma amostra apresentava ANV e parvovírus de galinha e em outra estava presente astrovírus de galinha e parvovírus de galinha. O vírus da bronquite infecciosa das galinhas, rotavírus aviário e reovírus aviário, não foram detectados neste grupo de ovos. Existiram dez (10), nove (09) e oito (08) amostras negativas, respectivamente, na primeira, segunda, e na terceira passagem.

Astrovírus de galinha (*CAstV*).

Foram isoladas cinco (05) amostras puras para astrovírus de galinha. Uma isolada na primeira, segunda e terceira passagem, outra na primeira e terceira passagem. Na segunda e terceira passagem uma amostra foi isolada. Uma amostra foi isolada apenas na primeira passagem e outra apenas na segunda passagem.

Vírus da Nefrite Aviária (*ANV*)

Foram isoladas quatro (04) amostras puras para o vírus da nefrite aviária, duas na segunda e terceira passagem, outra na primeira passagem. Uma amostra foi isolada apenas na terceira passagem.

Parvovírus de Galinha (*ChPV*)

Uma amostra pura para parvovírus de galinha foi isolada na primeira passagem.

Adenovírus Aviário do Tipo (*FAdV-1*)

Na primeira, segunda e terceira passagem, foi isolada uma amostra pura para adenovírus aviário do tipo 1.

O número da amostra inoculada, o vírus inoculado, o vírus isolado e a passagem onde o vírus foi detectado nas amostras do grupo 4 se apresentam na tabela 14. As amostras foram isoladas na primeira, segunda e terceira passagem nos ovos embrionados de galinha *SPF*, como se apresenta na tabela 14. A tabela 15 e as figuras 7 e 8 mostram o número de amostras positivas para cada vírus estudado.

Tabela 14 - Vírus presente na amostra inoculada, passagem, e o vírus detectado por RT-PCR e PCR no grupo de ovos 4

N.	Origem Amostra	RT-PCR e PRC Diagnóstico LABOR	RT-PCR e PCR para Reconfirmação de Positividade	RT-PCR e PCR das Passagens em Ovos Embrionados Livres de Patógenos Específicos		
				Amostras Isoladas 1ª Passagem	Amostras Isoladas 2ª Passagem	Amostras Isoladas 3ª Passagem
71	400-6	ANV	ANV	-	ANV	ANV
72	400-3	ANV	ANV	-	-	-
73	400-2	ANV	ANV	-	ANV	ANV
74	354-6	ANV	ANV	ANV	CAstV + ANV	-
75	362-3 (astro)	CAstV	ANV	ANV + ChPV	ANV + ChPV	-
76	359-2 int	CAstV	CAstV	-	CAstV	-
77	358-2 astro	ANV	CAstV	-	CAstV	CAstV
78	365-5 int	ChPV	CAstV + ChPV	-	-	-
79	336-6	ChPV	CAstV + ANV	ChPV	-	-
80	362-5 astro	CAstV	CAstV + ANV + ChPV	CAstV + ChPV	-	CAstV
81	336-18 astro	CAstV	CAstV + ANV	CAstV	CAstV	CAstV
82	336-18	CAstV	CAstV + ANV	CAstV	-	CAstV + ANV
83	336-6 PARVO -	ChPV	ChPV ANV + BIG	-	-	CAstV + ANV
84	336-6 PA VO	ChPV	ChPV ANV + BIG	-	-	ANV
85	400-8B rim	ChPV	-	-	-	-
86	102 Diag	ChPV	FadV 1	FadV-1	FadV-1	FadV-1
87	CONTROLE -			-	-	-

Tabela 15 - Número de amostras RT-PCR e PCR positivas e negativas para cada vírus estudado no grupo de ovos 4

Vírus Identificado	Amostras Isoladas 1ª Passagem	Amostras Isoladas 2ª Passagem	Amostras Isoladas 3ª Passagem
CAstV	2	3	3
ANV	1	2	3
ChPV	1	0	0
BIG	0	0	0
Reovírus Aviário	0	0	0
Rotavírus Aviário	0	0	0
FAdV-1	1	1	1
CAstV + ANV	0	1	2
ANV + ChPV	1	1	0
CAstV + ChPV	1	0	0
Negativas	10	9	8
TOTAL	17	17	17

Figura 7- Número de amostras virais isoladas no grupo de ovos 4nas três passagens realizadas

Figura 8 - Amostras RT-PCR e PCR positivas e negativas na terceira e sexta passagem do grupo de ovos 4

Considerando todos os grupos de ovos analisados, verificou-se ausência de Rotavírus aviário nas amostras estudadas, sendo isolados neste estudo, em amostras puras, os vírus: duas amostras do Parvovírus de galinha (ChPV); oito (08) amostras de Astrovírus de galinha (CAstV); 16 amostras do Vírus da Nefrite Aviária (ANV); sete (07) amostras do Vírus da Bronquite Infecciosa das Galinhas (BIG); três (03) amostras de Reovírus Aviário e onze (11) amostras de Adenovírus Aviário do Tipo 1. As figuras 9 e 10 apresentam estes resultados.

A presença do vírus da doença de Newcastle foi evidente no segundo grupo de ovos, em algumas amostras foi encontrado sozinho ou em combinações com outros vírus. As amostras virais isoladas nos quatro grupos de ovos *SPF* se apresentam na tabela 16.

Tabela 16 - Vírus isolados nos quatro grupos de ovos embrionados *SPF*

Vírus Isolados	Primeiro Grupo de Ovos	Segundo Grupo de Ovos	Terceiro Grupo de Ovos	Quarto Grupo de Ovos	Total
FAdV-1	0	9	1	1	11
ChPV	0	0	1	1	2
CAstV	0	0	3	5	8
ANV	4	0	8	4	16
Rotavírus Aviário	0	0	0	0	0
Reovírus Aviário	1	2	0	0	3
BIG	6	0	1	0	7
NDV	0	11	0	0	11
Combinações virais					
ANV + Reovírus Aviário	1	0	0	0	1
FadV-1 + NDV	0	9	0	0	9
Reovírus Aviário + NDV	0	1	0	0	1
BIG + NDV	0	1	0	0	1
CAstV + ChPV	0	0	1	1	2
CAstV + ANV	0	0	0	3	3
ANV + ChPV	0	0	0	1	1
ANV + NDV	0	2	0	0	2
TOTAL	12	35	15	16	78

Figura 9- Número total de amostras virais isoladas nos ovos embrionados de galinhas livres de patógenos específicos (*SPF*)

Figura 10 – Amostras RT-PCR e PCR positivas detectadas nos grupos de ovos embrionados de galinha livres de patógenos específico (SPF)

5.2 ESTRATÉGIA DE ISOLAMENTO, CULTIVO E PROPAGAÇÃO DE VÍRUS ENTÉRICOS EM OVOS EMBRIONADOS LIVRES DE PATÓGENOS ESPECÍFICOS (*SPF*)

Os vírus entéricos para serem propagados nos ovos embrionados *SPF* foram inoculados por via saco da gema, por esta ser a via mais utilizada para a propagação destes vírus. Nos grupos 1 e 2 de ovos embrionados *SPF* não foi possível isolar cepas virais de astrovírus de galinhas, parvovírus de galinha e rotavírus aviário.

Houve um melhor isolamento, cultivo e propagação viral quando o inoculo era preparado da seguinte maneira:

As amostras selecionadas para serem inoculadas foram testadas novamente pela RT-PCR e PCR e assim foi confirmada mais uma vez a presença do vírus. A suspensão utilizada para a realização das provas moleculares foi reutilizada para a realização do inoculo destinado aos ovos. Esta estratégia de isolamento, cultivo e propagação viral foi usada nos grupos 3 e 4, sendo isolado astrovírus de galinha, vírus da nefrite aviária, parvovírus de galinha e adenovírus aviário do tipo 1, desde a primeira passagem.

O uso da suspensão usada na detecção viral é uma estratégia que poderia ser utilizada para o isolamento e propagação de vírus entéricos, especialmente, para o isolamento ocorreria em cultivo puro.

5.3 CARACTERIZAÇÃO MACROSCÓPICA DAS LESÕES QUE OS VÍRUS ENTÉRICOS PRODUZIRAM NOS EMBRIÕES DE GALINHA

Uma vez realizado o sacrifício, os embriões foram examinados para a observação de lesões e alterações macroscópicas. Os embriões do grupo 4 não apresentaram nenhum tipo de lesão ou alteração. Os embriões dos grupos 1, 2 e 3 apresentaram lesões e alterações macroscópicas como hemorragias, edema, nanismo, aspecto gelatinoso e deformidades.

As lesões macroscópicas foram avaliadas qualitativamente determinando a presença (positivo) ou ausência (negativo) de lesões. As tabelas 17, 18, 19 e 20 e as figuras 11, 12, 13 e 14 mostram as lesões encontradas nos embriões onde foram isolados os vírus entéricos. As tabelas 21 e 22 mostram a mortalidade apresentada nos embriões onde foram isolados os vírus entéricos.

Tabela 17 - Lesões macroscópicas avaliadas no grupo de ovos 1

Número de Embriões com Lesão	Vírus	Lesões Macroscópicas											
		Hemorragias		Edema		Deformidades		Aspecto Gelatinoso		Nanismo		Enrolamento	
		Avaliação	N.	Avaliação	N.	Avaliação	N.	Avaliação	N.	Avaliação	N.	Avaliação	N.
0	FAdV-1	NI		NI		NI		NI		NI		NI	
0	ChPV	-		-		-		-		-		-	
0	CAstV	-		-		-		-		-		-	
18	ANV	+	15/18	+	16/18	-	0/18	+	14/18	+	17/18	+	12/18
0	Rotavírus Aviário	-		-		-		-		-		-	
3	Reovírus Aviário	+	1/3	-	0/3	+	0/3	+	0/3	+	0/3	-	0/3
29	BIG	+	20/29	-	3/29	-	0/29	-	0/29	+	24/29	+	24/29
6	Controle Negativo	-		-		-		-		-		-	

NI=Não Inoculado; N.=Número de embriões com lesão

Figura 11 – Lesões Macroscópicas avaliadas no grupo de ovos 1

Tabela 18 - Lesões macroscópicas avaliadas no grupo de ovos 2

Número de Embriões com Lesão	Vírus	Lesões Macroscópicas											
		Hemorragias		Edema		Deformidades		Aspecto Gelatinoso		Nanismo		Enrolamento	
		Avaliação	N.	Avaliação	N.	Avaliação	N.	Avaliação	N.	Avaliação	N.	Avaliação	N.
25	FAdV-1	+	17/25	+	15/25	+	19/25	+	23/25	+	18/25	-	0/25
0	ChPV	-		-		-		-		-		-	
0	CAstV	-		-		-		-		-		-	
0	ANV	-		-		-		-		-		-	
0	Rotavírus Aviário	-		-		-		-		-		-	
6	Reovírus Aviário	+	6/6	+	6/6	+	6/6	+	6/6	+	6/6	-	0/6
0	BIG	-		-		-		-		-		-	
6	Controle Negativo	-		-		-		-		-		-	

NI=Não Inoculado; N.=Número de embriões com lesão

Figura 12 – Lesões Macroscópicas avaliadas no grupo de ovos 2

Tabela 19 - Lesões macroscópicas avaliadas no grupo de ovos 3

Número de Embriões com Lesão	Vírus	Lesões Macroscópicas											
		Hemorragias		Edema		Deformidades		Aspecto Gelatinoso		Nanismo		Enrolamento	
		Avaliação	N.	Avaliação	N.	Avaliação	N.	Avaliação	N.	Avaliação	N.	Avaliação	N.
3	FAdV-1	+	3/3	+	3/3	-	0/3	-	0/3	+	3/3	-	0/3
3	ChPV	+	3/3	+	3/3	-	0/3	-	0/3	+	3/3	-	0/3
12	CAstV	+	12/12	+	9/12	-	0/12	-	0/12	+	12/12	-	0/12
36	ANV	+	35/36	+	36/36	-	36/36	-	36/36	+	34/36	-	36/36
0	Rotavírus Aviário	NI		NI		NI		NI		NI		NI	
0	Reovírus Aviário	NI		NI		NI		NI		NI		NI	
3	BIG	+	3/3	+	0/3	+	0/3	+	0/3	+	3/3	+	3/3
9	Controle Negativo	-	0/9	-	0/9	-	0/9	-	0/9	-	0/9	-	0/9

NI=Não Inoculado; N.=Número de embriões com lesão

Figura 13 – Lesões Macroscópicas avaliadas no grupo de ovos 3

Tabela 20 - Lesões macroscópicas avaliadas no grupo de ovos 4

Número de Embriões com Lesão	Vírus	Lesões Macroscópicas											
		Hemorragias		Edema		Deformidades		Aspecto Gelatinoso		Nanismo		Enrolamento	
		Avaliação	N.	Avaliação	N.	Avaliação	N.	Avaliação	N.	Avaliação	N.	Avaliação	N.
9	FAdV-1	-	0/9	-	0/9	-	0/9	-	0/9	-	0/9	-	0/9
3	ChPV	-	0/3	-	0/3	-	0/3	-	0/3	-	0/3	-	0/3
27	CAstV	-	0/27	-	0/27	-	0/27	-	0/27	-	0/27	-	0/27
12	ANV	-	0/12	-	0/12	-	0/12	-	0/12	-	0/12	-	0/12
0	Rotavírus Aviário	NI		NI		NI		NI		NI		NI	
0	Reovírus Aviário	NI		NI		NI		NI		NI		NI	
0	BIG	NI		NI		NI		NI		NI		NI	
9	Controle Negativo	-	0/9	-	0/9	-	0/9	-	0/9	-	0/9	-	0/9

NI=Não Inoculado; N.=Número de embriões com lesão

Figura 14 – Lesões Macroscópicas avaliadas no grupo de ovos 4

Tabela 21 - Mortalidade apresentada nos embriões inoculados com sete (07) dias de idade onde foram isolados os vírus entéricos

Vírus Isolado	Mortalidade Embrionária (Inoculação aos sete (07) dias de idade)												Total Vivos		Total Embrões
	24 horas		48 horas		72 horas		96 horas		120 horas		Total Mortos				
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N
CAstV	0	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	12	100	12
ANV	0	0	25	46.3	19	35.2	0	0	0	0	44	81.5	10	18.5	54
FAdV-1	0	0	9	32.1	5	17.9	1	3.57	0	0	15	53.6	13	46.4	28
Reovírus Aviário	0	0	6	66.7	1	11.1	0	0	0	0	7	77.8	2	22.2	9
Rotavírus Aviário	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BIG	0	0	20	62.5	3	9.38	0	0	0	0	23	71.9	9	28.1	32
ChPV	0	0	1	33.3	1	33.3	0	0	0	0	2	66.7	1	33.3	3
Controle -	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	21

NI=Não Inoculado; N=Número de embriões mortos

Tabela 22 - Mortalidade apresentada nos embriões inoculados com quatorze (14) dias de idade onde foram isolados os vírus entéricos

Vírus Isolado	Mortalidade Embrionária (Inoculação aos sete (14) dias de idade)												Total Vivos		Total Embrões
	24 horas		48 horas		72 horas		96 horas		120 horas		Total Mortos				
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N
CAstV	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	27	100	27
ANV	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12	100	12
FAdV-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	100	9
Reovírus Aviário	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
Rotavírus Aviário	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
BIG	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
ChPV	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	100	3
Controle -	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	9

NI=Não Inoculado; N=Número de embriões mortos

5.3.1 Padrões para a caracterização macroscópica de vírus entéricos.

Analizando as lesões encontradas nos embriões de todos os grupos de ovos, se determinou padrões que estão descritos abaixo.:

Astrovírus de Galinha (*CAstV*)

Nas três primeiras passagens os embriões se apresentaram completamente hemorrágicos e edematosos, com deformidades, o aspecto gelatinoso ocorreu em menor grau, o nanismo foi evidente, mas não apresentaram enrolamento. Estes resultados encontram-se na figura 15. Não houve mortalidade embrionária após a inoculação em nenhuma das passagens onde o vírus foi isolado, estes resultados se encontram na tabela 21.

Não se encontraram lesões nos embriões inoculados com 14 dias de idade, estes apresentavam aspecto aparentemente normal, assim como, os órgãos internos das cavidades torácica e abdominal. Não houve mortalidade neste grupo de ovos, a tabela 22 mostra estes resultados.

Figura 15- Lesões no embrião apresentadas no isolamento do *CAstV* em ovos embrionados de galinha *SPF*
(a) Embrião hemorrágico, edematoso, com aspecto gelatinoso, deformado e com nanismo (meio)
(b) Embriões hemorrágicos, edematosos, com aspecto gelatinoso, deformados e com nanismos

Vírus da Nefrite Aviária (ANV)

Nas primeiras três passagens os embriões onde foi isolado ANV se encontraram enrolados, muito hemorrágicos, marcado aspecto gelatinoso e presença de regiões levemente edematosas. Vários embriões mostravam a presença de deformidades. Na quarta, quinta e sexta passagem os embriões apresentaram as mesmas características descritas acima. A figura 16 mostra estes resultados. Os embriões apresentaram mortalidade de 81,5 % (Tabela 21) em 48 a 72 horas após a inoculação.

Os embriões inoculados com 14 dias de idade apresentavam aspecto aparentemente normal, não se encontraram lesões, assim como nos órgãos das cavidades torácica e abdominal. Não houve mortalidade (Tabela 22).

Figura 16– Lesões no embrião apresentadas no isolamento do ANV em ovos embrionados de galinha *SPF*
(a) À direita embrião normal; à esquerda embriões hemorrágicos, edematosos, com aspecto gelatinoso e com nanismo
(b) Embriões hemorrágicos, edematosos, com aspecto gelatinoso, deformados e com nanismo

Parvovírus de Galinha (*ChPV*)

Os embriões na primeira passagem apresentaram hemorragias, edema e nanismo, não apresentavam enrolamento. Na figura 17 encontram-se estes resultados. A mortalidade embrionária de 66,7 % (Tabela 21) ocorreu em 48 -72 horas após a inoculação.

Os embriões inoculados com 14 dias de idade não apresentaram lesão mostravam um aspecto aparentemente normal, os órgãos da cavidade torácica e abdominal dos embriões se apresentavam sem lesões e com aspecto normal. Não houve mortalidade (Tabela 22).

Figura 17– Lesões no embrião apresentadas no isolamento do ChPV em ovos embrionados de galinha *SPF*
(a) Na direita e no centro embriões hemorrágicos, edematosos e com nanismo
(b) Embriões hemorrágicos, edematosos e com nanismo

Vírus da Bronquite Infecciosa das Galinhas (BIG)

Em algumas amostras os embriões nas primeiras passagens não apresentavam lesões aparentes mostrando aspecto normal, porém depois de três passagens, os embriões apresentaram hemorragias, nanismo e enrolamento. A figura 18 mostra estes resultados.

Uma característica importante nos embriões infectados com BIG foi que eles se encontravam grudados na membrana do saco da gema. A mortalidade embrionária de 71,9 % (Tabela 21) foi encontrada em 48 a 72 horas após a inoculação.

Figura 18 – Lesões no embrião apresentadas no isolamento do BIG em ovos embrionados de galinha *SPF*
(a) Na esquerda, embrião normal; na direita, embriões hemorrágicos, enrolados e com nanismo

Reovírus Aviário

Nas três primeiras passagens os embriões infectados com o reovírus aviário apresentaram aspecto normal, na quarta, quinta e sexta passagem os embriões estavam hemorrágicos, apresentavam edemas e deformidades, nanismo e com aspecto gelatinoso evidente. Vários embriões estavam com um pequeno desenvolvimento. A figura 19 apresenta estes resultados. A mortalidade de 77,8 % (Tabela 21) ocorreu em 48 - 72 horas após a inoculação.

Figura 19– Lesões no embrião apresentadas no isolamento do Reovírus Aviário em ovos embrionados de galinha *SPF*
(a) Embriões hemorrágicos, edematosos, com aspecto gelatinoso e com nanismo

Adenovírus Aviário do Tipo 1 (*FAdV-1*)

Nas três primeiras passagens os embriões que apresentaram isolamento de adenovírus aviário do tipo 1, estavam hemorrágicos, pouco edematosos, com deformidades e aspecto gelatinoso esporádico. Vários embriões estavam com aspecto normal. Estes resultados encontram-se na figura 20. Os embriões apresentaram mortalidade de 53,6 % (Tabela 21) em 48 a 96 horas após a inoculação.

Os embriões inoculados com 14 dias de idade não apresentaram lesão, mostravam um aspecto aparentemente normal, os órgãos das cavidades torácicas e abdominais estavam sem lesões e com aspecto normal. Não houve mortalidade (Tabela 22).

Figura 20– Lesões no embrião apresentadas no isolamento do FAdV-1 em ovos embrionados de galinha *SPF*
(a) Embriões hemorrágicos, edematosos, com aspecto gelatinoso e com nanismo
(b) Embriões hemorrágicos e com nanismo

Controles Negativos

Os embriões do grupo controle negativo não apresentaram alteração, e não houve mortalidade (Tabela 21 e Tabela 22). A figura 21 apresenta estes resultados.

Figura 21 – (a) Embriões normais

5.4 DETECÇÃO DO ISOLAMENTO VIRAL ATRAVÉS DE PCR E RT-PCR

Astrovírus de Galinha (CAstV)

Nenhuma amostra foi positiva no grupo de ovos 1 e 2. Três (03) amostras foram positivas no grupo 3 de ovos e cinco (05) amostras foram positivas no grupo de ovos 4. Nas três primeiras passagens um total de oito (08) amostras puras foram detectadas. A figura 22 mostra os produtos amplificados, de 362 pb, pela RT-PCR de amostras positivas para CAstV.

Figura 22 - Eletroforese do produto amplificado pela RT-PCR para CAstV

Vírus da Nefrite Aviária (ANV)

No primeiro grupo de ovos quatro (04) amostras foram positivas, no segundo grupo todas foram negativas. No terceiro ou quarto grupo de ovos, respectivamente, oito (08) e quatro (04) amostras foram positivas, portanto um total de 16 amostras puras foram detectadas nas três primeiras e na sexta passagem. O produto amplificado, de 473 pb, pela RT-PCR de amostras positivas para ANV encontram-se na figura 23.

Figura 23 - Eletroforese do produto amplificado pela RT-PCR para ANV

Parvovírus de Galinha (*ChPV*)

Nenhuma amostra foi positiva no primeiro ou segundo grupo de ovos. No terceiro e quarto grupo de ovos uma amostra foi positiva, assim, foram obtidas duas amostras puras. A figura 24 mostra os produtos amplificados, de 561 pb, pela PCR das amostras positivas.

Figura 24- Eletroforese do produto amplificado pela PCR para ChPV

Adenovírus Aviário do Tipo 1 (*FAdV-1*)

Nenhuma amostra foi positiva no primeiro grupo de ovos. No segundo grupo de ovos foram isoladas nove (09) amostras positivas, no terceiro e quarto grupo de ovos a presença do vírus foi encontrada em uma amostra. Dessa forma, após a terceira passagem nos ovos foram isoladas 11 amostras puras. O produto amplificado, de 879 pb, pela PCR de amostras positivas para adenovírus aviário do tipo 1 se encontra na figura 25.

Figura 25- Eletroforese do produto amplificado pela PCR para FAdV-1

Vírus da Bronquite Infecciosa das Galinhas (BIG)

Nenhuma amostra foi positiva no segundo ou quarto grupo de ovos. No primeiro grupo e no terceiro grupo de ovos, respectivamente, seis (06) e uma amostras foram positivas. Após a terceira e a sexta passagem, sete (07) amostras puras foram isoladas. A figura 26 mostra o produto amplificado pela reação de *NESTED-RT-PCR*, de 179 pb.

Figura 26 - Eletroforese do produto amplificado pela *NESTED*-RT-PCR para BIG

Reovírus Aviário

O vírus estava presente em uma (01) amostra no grupo 1 de ovos, no segundo grupo duas amostras foram positivas. Assim, após a terceira e sexta passagem foram isoladas três (03) amostras puras. Nenhuma amostra foi positiva no terceiro ou quarto grupo de ovos. O produto amplificados de 1120 pb, pela RT-PCR de amostras positivas se apresentam na figura 27.

Figura 27- Eletroforese do produto amplificado pela RT-PCR para reovírus aviário

Rotavírus Aviário

Nenhuma amostra foi positiva nos quatro grupos de ovos, porém o produto amplificado pela RT-PCR do controle positivo utilizado resultou no produto esperado de 630 pb. A figura 28 mostra este resultado.

Figura 28- Eletroforese do produto amplificado pela RT-PCR para rotavírus aviário

6 DISCUSSÃO

Doenças entéricas na avicultura geram grandes perdas econômicas e vários vírus entéricos foram relacionados com estas. Embora os vírus entéricos na avicultura sejam reconhecidos por décadas, ainda há ausência de informações. No presente estudo foram isolados, cultivados e propagados vírus relacionados com problemas entéricos em aves no Brasil. Vírus que foram identificados em galinhas e perus com presença de doença entérica em vários países, mostrando sua ampla distribuição (KISARY et al., 1985; KANG; NAGARAJA; NEWMAN, 1986; CAVANAGH, 2005; CIRCELLA et al., 2007; DAY; SPACKMAN; PANTIN-JACKWOOD, 2007; PANTIN-JACKWOOD et al., 2007; ADAIR; FITZGERALD, 2008; IMADA, 2008; SPACKMAN; DAY; PANTIN-JACKWOOD, 2010; BANYAI et al., 2011; DE WIT et al., 2011; PALADE et al., 2011).

No Brasil o interesse e a importância das doenças entéricas têm aumentado na produção avícola, em consequência da repercussão econômica que estas trazem à indústria, tanto pela mortalidade como por problemas relacionados à diminuição do ganho de peso e falhas na conversão alimentar. Vários vírus entéricos foram identificados em perus e galinhas no Brasil, e mostram a possível relação que estes têm com os problemas entéricos nas aves em diferentes estados brasileiros (BELLO, 2011; MOURA-ALVAREZ, 2011). Astrovírus, coronavírus, adenovírus, rotavírus foram relacionado com problemas digestivos em humanos e em várias espécies de animais como gado, ovelhas, camundongos, cachorros e gatos, sendo que estes causaram surtos importantes com alta mortalidade (ESTES; KAPIKIAN, 2007; LAI; PERLMAN; ANDERSON, 2007; MAONDEZ E ARIAS, 2007; WOLD; HORWITZ, 2007). O envolvimento destes vírus na etiologia de problemas entéricos nestas espécies animais despertou o interesse pela presença destes vírus como causa de doenças entéricas na avicultura.

Várias amostras positivas para vírus relacionados com problemas entéricos em lotes comerciais de galinhas e frangos foram usados para a realização de seu isolamento, cultivo e propagação (IMADA; YAMAGUCHI; KAWAMURA, 1979; KISARY, 1985; ALI; REYNOLDS, 2000; BAXENDALE; MEBATSION, 2004; GUY, 2008; ALEMNESH et al., 2010; BANYAI et al., 2011).

Astrovírus de galinha, vírus da nefrite aviária, adenovírus aviário do tipo 1, vírus da bronquite infecciosa das galinhas, parvovírus de galinha e reovírus aviário foram isolados, cultivados e propagados em ovos embrionados de galinha *SPF*, confirmando a vantagem que os ovos embrionados ainda oferecem para a cultura viral (GUY, 1998; 2008).

Rotavírus aviário não foi isolado, cultivado e propagado neste estudo, trabalhos anteriores sugerem que para se isolar rotavírus aviário, o vírus precisa ser submetido a um processo de tripsinização, tratamento necessário para clivara proteína VP4 e deixar expostas as proteínas VP5 e VP8 (McNULTY, 2003; ESTES; KAPIKIAN, 2007). A exposição das proteínas VP5 e VP8 aumenta a virulência e penetração viral, pois são responsáveis pela união viral com a célula hospedeira. O mecanismo de ação da tripsina não está bem entendido, mas partículas virais tripsinizadas invadem as células mais rapidamente do que as partículas virais não tripsinizadas. A cultura de vários vírus requer a adição de proteases exógenas (tripsina) no inoculo (ESTES; KAPIKIAN, 2007). No presente estudo as amostras que foram destinadas ao isolamento de rotavírus aviário não foram tripsinizadas, e isto pode ter contribuído para que houvesse ausência de isolamento viral, nas seis passagens realizadas.

A idade embrionária é considerada determinante no sucesso ou fracasso do isolamento viral, idades padrão são consideradas no momento da inoculação, sugerindo de 9 a 11 dias para a inoculação por via saco alantóide, 10 a 11 dias para a inoculação por via membrana corioalantóide, 10 a 11 dias para a infecção por via saco amniótico e de 6 a 8 dias para a inoculação por via saco da gema (SENNE, 1998). Dessa forma, se selecionou a inoculação aos sete (07) dias de idade como a idade ótima para o isolamento viral por via saco da gema, porém, baseados na natureza entérica dos vírus e o grau de desenvolvimento embrionário, se realizou também a inoculação por via saco da gema aos 14 dias de idade, assim seria possível um melhor isolamento uma vez que os intestinos já estariam desenvolvidos e em funcionamento.

Astrovírus de galinha, vírus da nefrite aviária, parvovírus de galinha e adenovírus aviário do tipo 1 cresceram bem em ovos embrionados tanto em sete (07) como em quatorze (14) dias de idade. A idade de sete (07) dias já foi descrita como uma idade ótima para o isolamento viral (SENNE, 1998), porém a inoculação aos 14 dias poderia também ser uma idade preconizada para o isolamento destes vírus, pois nesta idade o intestino do animal por estar mais desenvolvido as

células intestinais provavelmente já possuíam os receptores para estes vírus, possibilitando a sua replicação e propagação, sem produzir lesões em outros tecidos do embrião. Embora outros autores recomendem o uso de ovos de 10 dias de idade e inoculação por via saco amniótico (CAVANAGH et al., 2002), neste estudo o vírus da bronquite infecciosa das galinhas cresceu bem em ovos embrionados de galinhas de sete dias de idade, com infecção pelo saco da gema. Reovírus aviário cresceu bem em ovos embrionados de galinha inoculados aos sete dias de idade, concordando com a idade indicada para o isolamento deste vírus em problemas de tenosinovite (ROSENBERGER; OLSON; HEIDE, 1998). No presente trabalho foram isoladas quatorze (14) amostras no grupo de ovos 3 e dez (10) amostras no grupo de ovos 4, assim foram isoladas quatro (04) amostras a mais no grupo de ovos 3. No entanto, ao se comparar o vírus isolado em cada amostra estudada se observa que em 10 amostras não ocorreu concordância do vírus isolado. Assim, em duas amostras (354-6, 336-6 PA VO) que em ovos de sete dias de idade foram negativas, naqueles com 14 dias de idade foi isolado ANV, talvez as células intestinais desta idade possam ter maior concentração de receptores para estes vírus e dependendo da concentração inicial possa ser isolado melhor com embriões desta idade. Por outro lado, o vírus da BIG não foi isolado em embriões de 14 dias de idade, sugerindo que para este vírus os receptores celulares estejam presentes em embriões com sete dias de idade. Os resultados obtidos não permitem se afirmar qual idade seria a ideal para ser utilizada no isolamento de vírus entéricos, pois seriam necessário se analisar um número maior de amostras, porém as duas idades poderiam ser usadas no isolamento, cultivo e propagação de vírus entéricos em ovos embrionados de galinha *SPF*.

Varias combinações virais foram encontradas no presente trabalho, entre ANV e reovírus aviário uma (1) amostra, entre reovírus aviário e NDV uma (1) amostra, entre FAdV-1 e NDV nove (9) amostras, entre ANV e NDV duas (2) amostras, entre BIG e NDV uma (1) amostra mostrando à alta presença do vírus de Newcastle, atrapalhando o isolamento dos vírus entéricos e a consecução de amostras virais puras. Outras combinações virais se apresentaram entre CAsV e ChPV duas (2) amostras, entre CAsV e ANV três (3) amostras e entre ANV e ChPV uma (1) amostra, combinações virais que são encontradas comumente no análise de amostras provenientes de aves com problemas entéricos, o que sugere que estes vírus podem se encontrar em concentrações mínimas no momento do diagnostico e muitas vezes não podem ser identificados, porém podem se replicar e propagar nos ovos embrionados e ser identificados

depois. A presença destas combinações virais faz que seja complicado o isolamento dos vírus entéricos e a caracterização macroscópicas das lesões.

As vias mais comumente usadas para a inoculação em ovos embrionados de galinha são a via do saco da gema, saco alantóide, membrana corioalantóide e saco amniótico, sendo a via do saco da gema sensível ao crescimento de uma ampla variedade de vírus (SENNE, 1998; GUY, 2008). Os vírus isolados neste estudo foram inoculados por via saco da gema, e esta se mostrou eficaz para o isolamento de vírus entéricos. A infecção por esta via e a natureza enterotrópica destes vírus pode contribuir para que estes ingressem diretamente nos órgãos digestivos do embrião, principalmente no intestino, encontrando neste local um meio ótimo para o seu cultivo, desenvolvimento e propagação. A gema por ter a função de nutrir o embrião, mantém contato direto desde poucas horas após a fecundação (NAKAZAWA et al., 2006). O embrião e as membranas de suporte possuem diversos tipos de células que permite a cultura de diversos vírus. Já foi reportado que: os vírus FAdV-1, BIG, Reovírus, Rotavírus, CAstV e ANV foram replicados em cultura primária de rim; em culturas primárias de fígado foram isolados FAdV-1, Rotavírus e CAstV; e BIG, Reovírus e ChPV cresceram bem em culturas primárias de fibroblastos e Reovírus aviário pode replicar em culturas primárias de pulmão (KISARY; MILLER-FAURES; ROMMELAERE, 1987; ADAIR; FITZGERALD, 2008; CABANAGH; GELB, 2008; IMADA, 2008; JONES, 2008; McNULTY; REYNOLDS, 2008; REYNOLDS; SCHULTZ-CHERRY, 2008), assim o embrião de galinha se torna o melhor hospedeiro, ou melhor, meio de cultura para estes vírus. No presente estudo os vírus foram isolados do embrião e da gema.

A mortalidade dos embriões inoculados com sete (07) dias de idade, onde se identificou o vírus da nefrite aviária foi de 81,5% e esta ocorreu em 2 – 3 dias de infecção, no entanto, estudos demonstraram que a mortalidade por este vírus ocorreu entre 3 a 14 dias após a inoculação (IMADA et al., 1981; IMADA, 2008). O vírus da bronquite infecciosa das galinhas causou mortalidade em 71,9% dos ovos, em 2 – 3 dias da inoculação. Este resultado corrobora estudos anteriores onde a mortalidade ocorreu entre 2 a 7 dias após a inoculação em ovos embrionados infectados com BIG relacionado com problemas respiratórios (GELB; JACKWOOD, 1998; CAO et al., 2011). Estudo com FAdV-1 isolado em ovos embrionados, a partir de surtos de hepatites por corpos de inclusão, mostrou que a mortalidade ocorreu entre 4-11 dias após a inoculação, em

100% dos embriões (ALEMNESH et al., 2010), neste estudo a mortalidade nos ovos infectados com este vírus foi de 53,6% e ocorreu entre 2 a 4 dias da infecção. Com reovírus aviário a mortalidade ocorreu entre 24 a 96 horas após a inoculação, em 77,8% dos embriões. Não houve 100% de mortalidade em nenhum grupo de ovos inoculado. Astrovírus de galinha não ocasionou mortalidade em nenhuma das passagens onde o vírus foi isolado. Estudo com embriões de peru inoculados com astrovírus de peru também descreveram ausência de mortalidade (REYNOLDS; SCHULTZ-CHERRY, 2008). A mortalidade embrionária para parvovírus de galinha foi descrita entre 3 a 11 dias após a inoculação (KISARY, 1985), enquanto neste estudo esta foi de 66,7%, entre 2 a 3 dias de infecção.

Parvovírus de galinha foi isolado somente na primeira passagem, não sendo detectado na segunda e terceira passagem, tanto em embriões com sete (07) como em 14 dias de idade. Dessa forma, é importante que a identificação viral seja realizada desde a primeira passagem, pois um isolado viral poderia ser detectado só na primeira passagem ou desde esta. Se a detecção viral não for realizada desde a primeira passagem, muitas vezes cepas virais poderiam se perder.

Várias amostras de astrovírus de galinha, vírus da nefrite aviária, adenovírus aviário do tipo 1, foram isoladas desde a primeira passagem, mantendo o vírus em passagens posteriores. No entanto, o vírus da bronquite infecciosa das galinhas e o reovírus aviário foram isolados na terceira e na sexta passagem, apresentando passagens cegas, característica destes vírus (GELF; JACKWOOD, 1998; SENNE, 1998; BANYAI et al., 2011). Cepas isoladas de BIG não se adaptaram e não produziram morte no embrião nas duas primeiras passagens (GELF; JACKWOOD, 1998), estes resultados concordam com os encontrados neste estudo. Muitas vezes o vírus não é identificado ou detectado na primeira passagem, e são necessárias passagens adicionais até que ocorra a adaptação viral aos tecidos embrionários (SENNE, 1998).

O crescimento do vírus em ovos embrionados pode ser detectado pela morte embrionária, lesões na membrana corioalantóidea como a formação de placas e edema, lesões no embrião como nanismo, hemorragias cutâneas e desenvolvimento anormal de músculos e penas, e anormalidades nos órgãos viscerais, incluindo alongamento do fígado ou coração e acúmulo de uratos nos rins (SENNE, 1998). No presente estudo as membranas de suporte dos ovos não

apresentaram alteração, porém os embriões apresentaram lesões macroscópicas caracterizadas por hemorragias, edema, nanismo, deformidades e aspecto gelatinoso.

Os embriões inoculados, aos sete dias de idade, com astrovírus de galinha apresentaram hemorragias, edema e nanismo, alterações já descritas em estudos sobre patogenicidade do astrovírus de peru em embrião (REYNOLDS; SCHULTZ-CHERRY, 2008). Astrovírus de galinha já foi isolado em cultura celular primária de fígado de embrião de galinha e nas linhagens CACO-2 e MHC (BAXENDALE; MEBATSION, 2004; MAONDES; ARIAS, 2007), mas estudos experimentais realizados com cepas virais isoladas e cultivadas nestas linhagens celulares mostraram baixa patogenicidade e não foi possível determinar o desempenho do vírus *in vivo* (BAXENDALE; MEBATSION, 2004). O isolamento de CAstV realizado neste estudo, em ovos embrionados de galinha, poderá em estudos futuros determinar o desempenho deste vírus como causador de doença.

Uma marcada presença de hemorragias, edema, nanismo, deformidades e aspecto gelatinoso foram as lesões macroscópicas encontradas nos embriões, e estas correspondem à descrições anteriores (KISARY, 1985; IMADA, 2008; REYNOLDS; SCHULTZ-CHERRY, 2008; ALAMNESH et al., 2010; CAO et al., 2011).

No presente trabalho foi isolado parvovírus aviário, e os embriões apresentaram hemorragias intensas, edema e nanismo, características descritas anteriormente, mas em ovos infectados pela CAM (KISARY, 1985).

As características macroscópicas apresentadas nos embriões onde se isolou o vírus da bronquite infecciosa das galinhas foram as mesmas já descritas com isolados provenientes de aves com problemas respiratórios e inoculadas por via saco alantóide (CABANAGH; GELB, 2008; CAO et al., 2011). Neste estudo, nas três primeiras passagens os embriões se apresentavam normais e a partir da terceira passagem ocorreu nanismo, hemorragias e com frequência, o enrolamento.

Vírus da nefrite aviária causou intensos sinais clínicos como hemorragias, nanismo, edema e enrolamento, ou seja, de acordo com descrições anteriores (IMADA; YAMAGUCHI; KAWAMURA, 1979; IMADA, 2008).

As lesões apresentadas nos embriões onde reovírus aviário foi isolado concordam com os dados da literatura (ROSENBERGER; OLSON; HEIDE, 1998), e estas ocorreram a partir da quarta passagem, caracterizadas por intensa hemorragia, edema, deformidades, aspecto gelatinoso e nanismo. Todas estas características macroscópicas indicaram que os vírus entéricos atingiram o embrião, causando alterações que provocaram a morte embrionária, porém as membranas de suporte não apresentaram alterações.

Além das lesões no embrião e nas estruturas de suporte, os agentes virais podem ser detectados por meio do uso de técnicas moleculares, como a reação em cadeia pela polimerase e a transcriptase reversa da reação em cadeia pela polimerase, técnicas que estão sendo usadas frequentemente por sua alta sensibilidade e especificidade. Astrovírus de peru, astrovírus de galinha, rotavírus aviário, coronavírus aviário foram identificados pelas técnicas da PCR e da RT-PCR em lotes comerciais de galinhas e frangos em vários países do mundo inclusive no Brasil (ISMAIL; TANG; SAIF, 2003; PANTIN-JACKWOOD, 2007; PANTIN-JACKWOOD, 2008; HEWSON; OROURKE; NOORMOHAMMADI, 2010; SPACKMAN; DAY; PANTIN-JACKWOOD, 2010; BELLO, 2011; MOURA-ALVAREZ 2011). Trabalhos realizados têm desenvolvido técnicas de RT-PCR destinadas à detecção de grupo destes agentes virais (DAY et al., 2007). A detecção viral no presente estudo foi realizada por testes moleculares, com sequencias de genes já publicadas, sendo obtidos os produtos esperados (CAVANAGH et al., 2002; DAY; SPACKMAN; PANTIN-JACKWOOD, 2007; PANTIN-JACKWOOD et al., 2008; ZSAK; STROTHER; DAY, 2009).

Astrovírus de galinha, parvovírus de galinha, adenovírus aviário tipo 1 e o vírus da nefrite aviária foram identificados na primeira passagem, mostrando que alguns vírus podem ser isolados desde a primeira passagem ou ser isolados em uma única passagem ou ser isolados em passagens posteriores ou em varias passagens.

Astrovírus de galinha e o vírus da nefrite aviária pertencem à família *Astroviridae*, mas são geneticamente distintos, o isolamento do vírus da nefrite aviária em ovos embrionados já foi reportado em diferentes partes do mundo (IMADA; YAMAGUCHI; KAWAMURA, 1979). No Brasil não existem publicações de cepas de ANV isoladas a partir de amostras fecais provenientes de aves com doença entérica, embora se tenha descrições da presença do vírus

circulando nos lotes de aves comerciais em vários estados do Brasil (MOURA-ALVAREZ, 2011).

Não há publicações de isolamento e caracterização macroscópica de Astrovírus de galinha em ovos de galinha, embora o vírus estivesse presente em lotes comerciais (GUY, 1998; PANTIN-JACKWOOD; SPACKMAN; WOOLCOCK, 2006; PANTIN-JACKWOOD et al., 2007; DE WIT et al., 2011). Os resultados obtidos mostram as alterações que o vírus produz no embrião, estes resultados poderão em trabalhos futuros contribuir para o entendimento deste vírus e a sua relação com a gênese das doenças entéricas.

Vários trabalhos apresentaram o isolamento de adenovírus aviário do tipo 1 de *pools* de fígado e fezes provenientes de surtos relacionados com hepatite por corpos de inclusão (TORO et al., 1999; EL-ATTACHE; VILLEGAS, 2001; ALVARADO et al., 2007; ONO et al., 2007; ALEMNESH et al., 2010). Adenovírus aviário do tipo 1 foi detectado no laboratório de ornitopatologia da FMVZ-USP em lotes comerciais de frangos de corte com problemas digestivos no Brasil. Neste estudo, este vírus foi isolado, mas não existem informações sobre as amostras recebidas, se estavam relacionadas com hepatite por corpos de inclusão, uma vez que a doença ainda não foi reportada no país. O isolamento e a caracterização macroscópica deste vírus contribuirá para a realização de futuros trabalhos que poderão beneficiar a avicultura comercial no Brasil.

No presente trabalho o isolamento de várias amostras de adenovírus aviário do tipo 1 no segundo grupo de ovos, poderia ser relacionado a problemas digestivos em galinhas. A presença deste vírus nas amostras da qual foi inoculado outro vírus, mostra que muitas vezes o adenovírus não pode ser identificado no diagnóstico de rotina por se encontrar em uma quantidade viral mínima, mas ao ser propagado em ovos embrionados, aumenta a sua concentração viral.

O vírus da doença de Newcastle identificado em amostras no presente estudo, este poderia ser uma cepa vacinal, que pode persistir nos órgãos internos das aves e ser secretado através das fezes ou secreções nasais, porém para a confirmação deste dado as amostras teriam que ser sequenciadas e determinar a sua relação com cepas virais do tipo vacinal.

Parvovírus de galinha foi identificado e isolado em vários países do mundo (KISARY, 1985; PALADE et al., 2011), de lotes de aves comerciais apresentando problemas entéricos, caracterizados principalmente por diarreia (KISARY; NAGY; BITAY, 1984; KISARY et al., 1985; ZSAK; STROTHER; DAY, 2009). Não existem descrições de isolamento de parvovírus no Brasil. O isolamento de cepas de parvovírus de galinha no presente trabalho poderá auxiliar nos futuros estudos deste vírus.

Reovírus aviário foi relacionado com muitas doenças, sendo a tendosinovite a única na qual é considerado o agente causal, mas continuamente está sendo relacionado com problemas entéricos em lotes comerciais de perus e galinhas (PANTIN-JACKWOOD et al., 2008; SPACKMAN; DAY; PANTIN-JACKWOOD, 2010; BANYAI et al., 2011). As amostras isoladas neste estudo possibilitariam determinar se o vírus tem a capacidade de produzir a doença entérica em galinhas comerciais e a relação com os problemas entéricos presentes nas granjas no Brasil.

O isolamento viral é uma técnica complicada e complexa, porque não se conhece se o vírus está ou não viável, em consequência do tratamento ao que a amostra foi submetida. A qualidade da amostra é indispensável. Amostras estocadas por muito tempo em que a temperatura de armazenamento não se manteve constante ocasiona perdas da carga viral e morte do vírus. Astrovírus de galinha é muito sensível a trocas bruscas de temperatura (REYNOLDS; SCHULTZ-CHERRY, 2008).

O importante no isolamento viral é realizar o cultivo, propagação e isolamento viral o mais rápido possível usando os produtos e meios recomendados, como no caso de rotavírus aviário, a tripsinização. A detecção viral deveria ser feita desde a primeira passagem, e dependendo das características virais, relacionar a detecção molecular com a presença de características macroscópicas no embrião e nas membranas de suporte.

O tipo de tecidos ou espécimes submetidos para o isolamento viral dependerá da doença que está sendo suspeita, podendo usar diferentes tipos de tecidos, fezes ou suabes de secreções. Suspensões destas amostras devem ser preparadas em PBS, agitadas e submetidas ao tratamento térmico de congelamento e descongelamento para a lise celular e liberação do agente viral. A centrifugação suspenderá as partículas virais e estas poderão replicar e desenvolver dentro das

células que o ovo embrionado proporciona (McNULTY et al., 1981; SENNE, 1998; IMADA, 2008). No presente estudo não foi possível o isolamento viral de astrovírus de galinha, parvovírus de galinha no grupo de ovos 1 e 2, pois o inoculo foi preparado com esse procedimento. O sucesso do isolamento ocorreu após às modificações realizadas no preparo do inoculo, sendo usadas as suspensões das amostras positivas para o vírus em questão, assim foi possível o isolamento de várias amostras para astrovírus de galinha e parvovírus de galinha.

O sucesso do isolamento viral também depende de muitos outros fatores. Condições adversas, no momento da coleta, alterações de temperatura no transporte e armazenamento, podem danificar os tecidos e os agentes virais (SENNE, 1998). Para o isolamento viral em ovos embrionados é importante a origem destes, que devem ser provenientes de lotes certificados, e que garantissem que os mesmos estivessem livres de patógenos específicos, com ausência de anticorpos no ovo (SENNE, 1998; VILLEGAS; LUKERT, 1998). Os ovos utilizados neste estudo foram recebidos de uma empresa certificada, assim não ocorreram problemas de contaminação viral no isolamento.

Em muitas amostras do presente trabalho não foi detectado nenhum vírus nas seis passagens realizadas, estes resultados podem ser consequência de: baixa quantidade viral nas amostras, condições em que foram armazenadas as amostras, tempo de armazenamento da amostra, problemas na adaptação viral aos ovos embrionados, presença de outros vírus ou a necessidade de realização de passagens adicionais.

O estágio da doença vai determinar a maior ou menor presença viral nos hospedeiros, geralmente nas fases tardias da doença ou infecções intermitentes a concentração viral é baixa, que podem diluir-se na amostra. Nas fezes tem distribuição heterogênea, ocorrendo a detecção viral onde o vírus estava presente. A mais alta concentração de vírus foi em animais jovens entre um a 14 dias de idade (IMADA; YAMAGUCHI; KAWAMURA, 1979; KISARY, 1985; ISMAIL; TANG; SAIF, 2003; SPACKMAN; DAY; PANTIN-JACKWOOD, 2010).

Dificuldades na identificação poderiam estar relacionados com problemas na extração do DNA ou RNA, como elevadas concentrações de reagentes, presença de ácidos nucleicos provenientes de outra fonte não viral que alteram a pureza do material extraído e atrapalham na reação de amplificação (DEMEKE; JENKINS, 2010).

Ineficiente amplificação da PCR pode resultar quando uma quantidade insuficiente de DNA de apropriado peso molecular é usada ou pode ser devido à presença de inibidores no DNA extraído que reduz a eficiência e reprodutibilidade da PCR. A ação inibitória de vários componentes pode estar relacionada com precipitação do DNA, desnaturação do DNA ou habilidade da enzima polimerase de se ligar a íons de magnésio ocasionado pela presença de resíduos de reagentes usados na extração (fenol, etanol ou clorofórmio) (DEMEKE; JENKINS, 2010). Concentrações excessivas de proteína e DNA fragmentado inibem a PCR, atrapalhando a ação dos *primers* no momento da hibridização (DEMEKE; JENKINS, 2010).

Outra possível causa para a falha na PCR é a elevada concentração de DNA, que inibe a sua amplificação, problema que pode ter acontecido neste trabalho, sendo de muita importância a quantificação prévia do DNA ou RNA na amplificação e produção do cDNA (DEMEKE; JENKINS, 2010).

No diagnóstico de doenças o uso da PCR aumenta o sucesso da identificação viral, porque o teste detecta quantidades mínimas de ácidos nucleicos virais (DNA) presentes nas amostras (VILA et al., 2009).

O limite de detecção do DNA nas reações de PCR e RT-PCR usados no presente estudo não foram determinados, dado que seria importante nos estudos futuros.

O isolamento de astrovírus de galinha, vírus da nefrite aviária, vírus da bronquite infecciosa das galinhas, parvovírus de galinha e reovírus aviário no presente trabalho, mostra que a inoculação por via saco da gema é eficaz para seu isolamento, cultivo e propagação. A idade escolhida (7 ou 14 dias) para a realização da inoculação propõe uma alternativa para a realização do isolamento de vírus entéricos ou vírus relacionados com doenças entéricas. A caracterização macroscópica das lesões provocadas pelos vírus ajudaram no diagnóstico e detecção viral, embora as lesões apresentadas nos embriões para os diferentes vírus sejam muito parecidas e não apresentem sinais patognômicos do agente viral, mas a presença de lesões, hemorragias, edema, nanismo, enrolamento, aspecto gelatinoso e deformações trarão a suspeita da presença de algum destes vírus estudados.

7 CONCLUSÕES

- Os ovos embrionados continuam sendo o melhor sistema hospedeiro para o isolamento, cultivo e propagação de vírus entéricos.
- Astrovírus de galinha, vírus da nefrite aviária, adenovírus aviário do tipo 1, vírus da bronquite infecciosa das galinhas, parvovírus de galinha e reovírus aviário foram isolados em ovos embrionados de galinha livres de patógenos específicos (*SPF*).
- A inoculação por via saco da gema favorece o isolamento de astrovírus de galinha, vírus da nefrite aviária, adenovírus aviário do tipo 1, vírus da bronquite infecciosa das galinhas, parvovírus de galinha e reovírus aviário.
- Embriões com sete ou catorze dias de idades são adequados para o isolamento de vírus entéricos em ovos embrionados de galinha.
- Rotavírus aviário não pode ser isolado em ovos embrionados de galinha sem ser previamente tripsinizado.
- As lesões observadas nos embriões foram caracterizadas por hemorragias, edemas, nanismo, deformações, aspecto gelatinoso e enrolamento.
- As características macroscópicas encontradas nos embriões são similares entre os vírus e não denotam padrões patognomônicos de cada vírus.
- A reação de PCR e RT-PCR se mostraram sensíveis e específicas para a identificação de astrovírus de galinha, vírus da nefrite aviária, adenovírus aviário do tipo 1, vírus da bronquite infecciosa das galinhas, parvovírus de galinha, rotavírus aviário e reovírus aviário nos ovos embrionados.

- A identificação viral deve ser realizada desde a primeira passagem, para se evitar a perda de isolados virais, que podem desaparecer em passagens posteriores.

REFERÊNCIAS

- ADAIR, B. M.; FITZGERALD, S. D. Group I adenovirus infections. In: SAIF, Y. M.; FADLY, A. M.; GLISSON, J. R.; McDOUGALD, L. R.; NOLAN, L. K.; SWAYNE, D. E. **Diseases of Poultry**. 12. ed. Florida State: Blackwell, 2008. p. 252-266.
- ALEMNESH, W.; HAIR-BEJO, M.; AINI, I.; OMAR, A. R. Pathogenicity of fowl adenovirus in specific pathogen free chicken embryos. **Journal Comparative Pathology**, v. 1, p. 1-7, 2010.
- ALI, A.; REYNOLDS, D. L. Characterization of the stunting syndrome agent: relatedness to known viruses. **Avian Diseases**, v. 44, p. 45-50, 2000.
- ALVARADO, I. R.; VILLEGAS, P.; EL-ATTRACHE, J.; JENSEN, E.; ROSALES, G.; PEROZO, F.; PURVIS, L. B. Genetic characterization, pathogenicity, and protection studies with an avian adenovirus isolate associated with inclusion body hepatitis. **Avian Diseases**, v. 51, n. 1, p. 27-32, 2007.
- BANYAI, K.; DANDAR, E.; DORSEY, K. M.; MATO, T.; PALYA, V. The genomic constellation of a novel *Avian Orthoreovirus* strain associated with Runting-Stunting syndrome in broilers. **Virus Genes**, v. 42, p. 82-89, 2011.
- BAXENDALE, W.; MEBATSION, T. The isolation and characterization of astroviruses from chickens. **Avian Pathology**, v. 33, n 3, p. 364-370, 2004.
- BELLO, C. P. Detecção molecular e diagnostico diferencial de vírus entéricos em aves comerciais. 2011. 113f. **Dissertação** (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.
- BENAVENTE, J.; MARTINEZ-COSTAS, J. Avian reovirus: structure and biology. **Virus Research**, v. 123, p. 105-119, 2007.
- BERK, A. J. *Adenoviridae*: the viruses and their replication. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M.; GRIFFIN, D. E.; LAMB, R. A.; MARTIN, M. A.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S. E. **Fields Virology**. 5. Ed. Boston State: Lippiconttt Williams & Wilkins, 2007. p. 2356-2394.
- BERNS, K.; PARRISH, C. R. *Parvoviridae*. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M.; GRIFFIN, D. E.; LAMB, R. A.; MARTIN, M. A.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S. E. **Fields Virology**. 5. ed. Boston State: Lippiconttt Williams & Wilkins, 2007. p. 2438-2477.

BIDIN, M.; LOJKIC, I.; BIDIN, Z.; TISLJAR, M.; MAJNARIC, D.; MIKEC, M. Detection and characterization of avian nephritis virus in ducklings. **Avian Pathology**, v. 40, n. 2, p. 173-177, 2011.

BUNGER, D. A. N.; CHACON, J. L.; JONES, R. C.; FERREIRA, A. J. P. Detection and Molecular Characterization of Gene 3 and 5 of Turkey Coronavirus from Turkeys with Severe Enteritis in Brazil. **Avian Diseases**, v. 53, p. 356-362, 2009.

CAO, Z.; HAN, Z.; SHAO, Y.; GENG, H.; KONG, X.; LIU, S. Proteomic analysis of chicken embryonic trachea and kidney tissues after infection in ovo by avian infectious bronchitis coronavirus. **Proteome Science**, v. 9, n. 11, p. 1-17, 2011.

CARTER, J. C.; SAUNDERS, V. A. Methods used in virology. In: CARTER, J. C.; SAUNDERS, V. A. **Virology Principles and Applications**. John Wiley and Sons Ltd.: United States. 2007. p. 9-29.

CAVANAGH, D. Coronaviruses in poultry and other birds. **Avian Pathology**, v. 34, n. 6, p. 439-448, 2005.

CAVANAGH, D.; GELB, J. J. Infectious bronchitis. In: SAIF, Y. M.; FADLY, A. M.; GLISSON, J. R.; McDOUGALD, L. R.; NOLAN, L. K.; SWAYNE, D. E. **Diseases of Poultry**. 12. ed. Iowa State: Blackwell, 2008. p. 117-135.

CAVANAGH, D.; MAWDITT, D.; WELCHMAN, B.; BRITTON, P.; GOUGH, R. E. Coronaviruses from Pheasants (*Phasianus colchicus*) are genetically closely related to coronaviruses of domestic fowl (infectious bronchitis virus) and turkeys. **Avian Pathology**, v. 31, p. 81-93, 2002.

CHACON, J. L. V. Vírus da laringotraqueíte infecciosa: detecção e caracterização molecular, isolamento, diagnostico diferencial e epidemiologia de um surto em granjas de poedeiras comerciais na região de Bastos, Estado de São Paulo. 2005. 115f. **Dissertação** (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

CIRCELLA, E.; CAMARDA, A.; MARTELLA, V.; BRUNI, G.; LAVAZZA, A.; BUONAVOGLIA, C. Coronavirus associated with an enteric syndrome on a quail farm. **Avian Disease**, v. 36, p. 251-258, Jun, 2007.

CONDIT, R. C. Principles of Virology. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M.; GRIFFIN, D. E.; LAMB, R. A.; MARTIN, M. A.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S. E. **Fields Virology**. 5. ed. Boston State: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. p. 25-57.

COUGH, R. E.; BORLAND, E. D.; KEYMER, I. F.; STUART, J. C. An outbreak of duck hepatitis type II in commercial ducks. **Avian Pathology**, v, 14, p. 227-236, 1985.

DAI, Y. C.; XU, Q. H.; WU, X. B.; HU, G. F.; TANG, Y. L.; LI, J. D.; CHEN, Q.; NIE, J. Development of real-time and nested RT-PCR to detect astrovirus and one-year survey of astrovirus in Jiangmen city, China. **Archives of Virology**, v. 155, n. 6, p. 977-982, 2010.

DAY, J. M.; ZSAK, L. Determination and analysis of the full-length chicken parvovirus genome. **Journal Virology**, v. 399, n. 1, p. 59-64, 2010.

DAY, J.C. M.; SPACKMAN, E.; PANTIN-JACKWOOD, M. A multiplex rt-pcr test for the differential identification of turkey astrovirus type 1, turkey astrovirus type 2, chicken astrovirus, avian nephritis virus and avian rotavirus. **Avian Diseases**, v. 51, p. 681-684, 2007.

DE WIT, J. J.; TEM DAM, G. B.; VAN DE LAAR, J. M. A. M.; BIERMANN, Y.; VERSTEGEN, I.; EDENS, F.; SCHRIER, C.C. Detection and characterization of a new astrovirus in chicken and turkeys with enteric and locomotion disorders. **Avian Pathology**, v. 1, p. 1-9, 2011.

DEMEKE, T.; JENKINS, G. R. Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 396, p. 1977-1990, 2010.

EL-ATTACHE, J.; VILLEGAS, P. Genomic identification and characterization of avian adenoviruses associated with inclusion body hepatitis. **Avian Diseases**, v. 45, p. 780-787, 2001.

ESTES, M. K.; COHEN, J. Rotavirus gene structure and function. **Microbiological Reviews**, v. 53, n. 4, p. 410-449, 1989.

ESTES, M. K.; KAPIKIAN, A. Z. *Rotaviruses*. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M.; GRIFFIN, D. E.; LAMB, R. A.; MARTIN, M. A.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S. E. **Fields Virology**. 5. ed. Boston State: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. p. 1918-1974.

FITZGERALD, S. D. Adenovirus infections. In: SAIF, Y. M.; FADLY, A. M.; GLISSON, J. R.; McDOUGALD, L. R.; NOLAN, L. K.; SWAYNE, D. E. **Diseases of Poultry**. 12. ed. Florida State: Blackwell, 2008. p. 251-252.

GELB, J.; JACKWOOD, M. W. Infectious bronchitis. In: SWAYNE-CHAIRMAN, D. E.; GLISSON, J. R.; JACKWOOD, M. W.; PEARSON, J. E.; REED, W. M. **A Laboratory manual**

for the isolation and identification of avian pathogens. 4. ed. Florida State: Rose Printing, 1998. p. 169-174.

GOLDENBERG, D.; PASMANIK-CHOR, M.; PIRAK, M.; KASS, N.; LUBLIN, A.; YEHESEKEL, A.; HELLER, D.; PITCOVSKI, J. Genetic and antigenic characterization of sigma C protein from avian reovirus. **Avian Pathology**, v. 39, n 3, p. 189-199, 2010.

GOMIS, S.; GOODHOPE, R.; OJKIC, D.; WILLSON, P. inclusion body hepatitis as a primary disease in broilers in Saskatchewan, Canada. **Avian Diseases**, v. 50, p. 550-555, 2006.

GOODWIN, M. A. Adenovirus inclusion body ventriculitis in chickens and captive bobwhite quail (*Colinus virginianus*). **Avian Diseases**, v. 37, p. 568-571, 1993.

GOODWIN, M. A.; DAVIS, J. F.; McNULTY, M. S.; BROWN, J.; PLAYER, E. C. Enteritis (So-called Runting Stunting Syndrome) in Georgia broiler chicks. **Avian Diseases**, v. 37, p. 451-458, 1993.

GUNERATNE, J. R. M.; JONES, R. C.; GEORGIOU, K. Some observations on the isolation and cultivation of avian reoviruses. **Avian Pathology**, v. 11, p. 453-462, 1982.

GUY, J. S. Isolation and propagation of coronaviruses in embryonated eggs. **Methods in Molecular Biology**, v. 454, n. 2, p. 109-117, 2008.

GUY, J. S. Virus infectious of the gastrointestinal tract of poultry. **Poultry Science**, v. 77, p. 1166-1175, 1998.

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, p. 713-722, 1987.

HEWSON, K. A.; OROURKE, D.; NOORMOHAMMADI, A. H. Detection of avian nephritis virus in Australian chicken flocks. **Avian Diseases**, v. 54, p. 990-993, 2010.

HIERHOLZER, J. C.; KILLINGTON, R. A. Virus isolation and quantitation. In: MAHY, B. WJ.; KANGRO, H. O. **Virology Methods Manual**. Academic Press Limited, 1996. p. 25-32.

HOFSTAD, M. S.; YODER, H. W. Avian infectious bronchitis – virus distribution in tissues of chicks. **Avian Diseases**, v. 10, n. 2, p. 230-239, 1966.

HUEFFER, K.; PARRISH, C. R. Parvovirus host range, cell tropism and evolution. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, p. 392-398, 2003.

IMADA, T. Avian Nephritis. In: SAIF, Y. M.; FADLY, A. M.; GLISSON, J. R.; McDOUGALD, L. R.; NOLAN, L. K.; SWAYNE, D. E. **Diseases of Poultry**. 12. ed. Iowa State: Blackwell, 2008. p. 409-425.

IMADA, T.; TANIGUCHI, T.; YAMAGUCHI, S.; MINETOMA, T. Susceptibility of chickens to avian nephritis virus at various inoculation routes and ages. **Avian Diseases**, vol. 25, n. 2, p. 194-302, 1981.

IMADA, T.; YAMAGUCHI, S.; KAWAMURA, H. Pathogenicity for baby chicks of the G-4260 strain of the picornavirus avian nephritis virus. **Avian Diseases**, v. 23, n. 3, p. 582-588, 1979.

IMADA, T.; YAMAGUCHI, S.; MASE, M.; TSUKAMOTO, K.; KUBO, M.; MOROOKA, A. Avian Nephritis Virus (ANV) as a new member of the family *Astroviridae* and construction of infectious ANV cDNA. **Journal of Virology**, v. 74, n. 18, p. 8487-8493, 2000.

ISMAIL, M. M.; TANG, Y.; SAIF, M. Y. Pathogenicity of turkey coronavirus in turkeys and chickens. **Avian Diseases**, v. 47, p. 515-522, 2003.

JIANG, P.; OJKIC, D.; TUBOLY, T.; HUBER, P.; NAGY, E. Application of the polymerase chain reaction to detect fowl adenoviruses. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 63, p. 124-128, 1999.

JINDAL, N.; PATNAYAK, D. P.; ZIEGLER, A. F.; GOYAL, S. M. Detection and molecular characterization of enteric viruses in breeder turkeys. **Avian Pathology**, v. 39, n. 1, p. 53-61, 2010.

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. 949-958, 2009.

JINDAL, N.; PATNAYAK, D. P.; ZIEGLER, A. F.; LAGO, A.; GOYAL, S. M. A Retrospective study on poult enteritis syndrome in Minnesota. **Avian Diseases**, v. 53, p. 268-275, 2009.

JONES, R. C. Avian Reovirus Infections. **Scientific and Technical Review of the International Epizootics**. v. 19, n. 2, p. 614-625, 2000.

JONES, R. C. Other Reovirus Infections. In: SAIF, Y. M.; FADLY, A. M.; GLISSON, J. R.; McDOUGALD, L. R.; NOLAN, L. K.; SWAYNE, D. E. **Diseases of Poultry**. 12. ed. Iowa State: Blackwell, 2008. p. 322-328.

- JONES, R. C. Reovirus infections. In: SAIF, Y. M.; FADLY, A. M.; GLISSON, J. R.; McDOUGALD, L. R.; NOLAN, L. K.; SWAYNE, D. E. **Diseases of Poultry**. 12. ed. Iowa State: Blackwell, 2008. p. 309-310.
- KANG, S. K.; NAGARAJA, K. V.; NEWMAN, J. A. Primary isolation and identification of Avian Rotaviruses from turkeys exhibiting signs of clinical enteritis in a continuous MA 104 cell line. **Avian Diseases**, v. 30, n 3, p. 494-499, 1986.
- KIBENGGE, F. S. B.; GWAZE, G. E.; JONES, R. C.; CHAMAN, A. F.; SAVAGE, C. E. Experimental reovirus infection in chickens: observations on early viraemia and vírus distribution in bone marrow, liver and enteric tissues. **Avian Pathology**, v. 14, p. 87-98, 1985.
- KISARY, J. Experimental infection of chicken embryos and day-old chickens with parvovirus of chicken origin. **Avian Pathology**, v. 14, p. 1-7, 1985.
- KISARY, J. Indirect immunofluorescence as a diagnostic tool for parvovirus infection of broiler chickens. **Avian Pathology**, v. 14, p. 269-273, 1985.
- KISARY, J.; AVALOSSE, B.; MILLER-FAURES, A.; ROMMELAERE, J. The genome structure of a new chicken virus identifies it as a parvovirus. **Journal General of Virology**, v. 66, p. 2259-2263, 1985.
- KISARY, J.; MILLER-FAURES, A.; ROMMELAERE, J. Presence of fowl parvovirus in fibroblast cell cultures prepared from uninoculated white leghorn chicken embryos. **Avian Pathology**, v. 16, p. 115-121, 1987.
- KISARY, J.; NAGY, B.; BITAY, Z. Presence of parvoviruses in the intestine of chickens showing stunting syndrome. **Avian Pathology**, v. 13, p. 339-343, 1984.
- KOCI, M. D.; SCHULTZ-CHERRY, S. Avian astroviruses. **Avian Pathology**, v. 31, p. 213-227, 2002.
- KOUWENHOVEN, B.; DAVELAAR, F. G.; VAN-WALSUN, J. Infectious proventriculitis causing runting in broilers. **Avian Pathology**, v. 7, p. 183-187, 1978.
- LAI, M. M. C.; PERLMAN, S.; ANDERSON, L. J. Coronaviridae. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. **Fields Virology**. 5. ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2007. p. 1306-1335.
- LIU, H-J.; LIN, P-Y.; LEE, J-W.; HSU, H-Y.; SHIH, W-L. Retardation of cell growth by avian reovirus p17 through the activation of p53 pathway. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 336, p. 709-715, 2005.

LIU, S.; CHEN, J.; CHEN, J.; KONG, X.; SHAO, Y.; HAN, Z.; FENG, L.; CAI, X.; GU, S.; LIU, M. Isolation of avian infectious bronchitis coronavirus from domestic peafowl (*Pavo cristatus*) and teal (*Anas*). **Journal of General Virology**, v. 88, p. 719-725, 2005.

MAEDA, M.; IMADA, T.; TANIGUCHI, T.; HORIUCHI, T. pathological changes in chicks inoculated with the picornavirus avian nephritis virus. **Avian Diseases**, v. 23, n. 3, p. 589-596, 1979.

MAITI, N. K.; SHARMA, S. N.; SAMBYAL, D. S. Isolation of infectious bronchitis virus from intestine and reproductive organs of laying hens with dropped egg production. **Avian Diseases**, v. 29, n. 2, p. 509-513, 1985.

MANDOKI, M.; BAKONYI, T.; IVANICS, E.; NEMES, C.; DOBOS-KOVACS, M.; RUSVAI, M. Phylogenetic diversity of avian nephritis virus in Hungarian chicken flocks. **Avian Pathology**, v. 35, n. 3, p. 224-229, 2006.

MAONDEZ, E.; ARIAS, C. A. Astroviruses. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. **Fields Virology**. 5. ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2007. p. 982-998.

MARUSAK, R. A.; GUY, J. S.; ABDUL-AZIZ, T. A.; WEST, M. A.; FLETCHER, O. J.; DAY, J. M.; ZSAK, L.; BARNES, H. J. Parvovirus-associated cerebellar hypoplasia and hydrocephalus in day old broiler chickens. **Avian Diseases**, v. 54, p. 156-160, 2010.

MASE, M.; MITAKE, H.; INOUE, T.; IMADA, T. Identification of group I-III avian adenovirus by PCR coupled with direct sequencing of the Hexon gene. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 71, n. 9, p. 1239-1242, 2009.

McFERRAN, J. Adenoviruses. In: SWAYNE, D. E.; GLISSON, C. J. R.; JACKWOOD, M. W.; PEARSON, J. E.; REED, W. M. **A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens**. 4. ed. The American Association of Avian Pathologists: University of Pennsylvania, 1998. p. 100-105.

McNULTY, M. S. Rotavirus infections. In: SAIF, Y. M.; BARNES, H. J.; GLISSON, J. R.; FADLY, A. M.; McDOUGALD, L.R.; SWAYNE, D. E. **Diseases of Poultry**. 11. ed. Iowa State: Blackwell, 2003. p. 308-320.

McNULTY, M. S.; ALLAN, G. M.; TODD, D.; McFERRAN, J. B.; McCRACKEN R. M. Isolation from chickens of a rotavirus lacking the rotavirus group antigen. **Journal General of Virology**, v. 55, p. 405-413, 1981.

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 electrophoretotypes. **Avian Pathology**, v. 9, p. 363-375, 1980.

McNULTY, M. S.; REYNOLDS, D. L. Rotavirus infections. In: SAIF, Y. M.; FADLY, A. M.; GLISSON, J. R.; McDOUGALD, L. R.; NOLAN, L. K.; SWAYNE, D. E. **Diseases of Poultry**. 12. ed. Iowa State: Blackwell, 2008. p. 338-350.

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.

MEANGER, J.; WICKRAMASINGUE, R.; ENRIQUEZ, C.; WILCOX, G. Immune response to avian reovirus in chickens and protection against experimental infection. **Australia Veterinary Journal**, v. 75, p. 428-432, 1997.

MERTENS, P. The dsRNA viruses. **Virus Research**, v. 101, p. 3-13, 2004.

MODAK, S. P. Chick-embryo culture techniques employed at Karnatak university in Dharwad, India, for studying cellular and molecular aspects of morphogenesis. **International Journal of Developmental Biology**, v. 47, p. 165-170, 2003.

MONTGOMERY, R. D.; BOYLE, C. R.; MASLIN, W. R.; MAGEE, D. L.; Attempts to reproduce a runting/stunting-type syndrome using infectious agents isolated from affected Mississippi broilers. **Avian Diseases**, v. 41, n.1, p. 80-92, 1997.

MORADIAN, A.; THORSEN, J.; JULIAN, R. J. Single and combined infections of specific-pathogen-free chickens with infectious bursal disease and an intestinal isolate of reovirus. **Avian Diseases**, v. 34, p. 63-72, 1990.

MOSER, L. A.; SCHULTZ-CHERRY, S. Pathogenesis of astrovirus infection. **Viral Immunology**, v. 18, n. 1, p. 4-10, 2005.

MOURA-ALVAREZ-ALVAREZ, J. Detecção molecular e diagnostico diferencial de vírus entéricos em criações de perus comerciais. 2011. 118f. **Dissertação** (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

MYERS, T. J.; SCHAT, K. A. Propagation of avian rotavirus in primary chick kidney cell and MA104 cell cultures. **Avian Diseases**, v. 33, p. 578-581, 1989.

NAKAZAWA, F.; ALEV, C.; JAKT, L. M.; SHENG, G. Yolk sac endoderm is the major source of serum proteins and lipids and is involved in the regulation of vascular integrity in early chick development. **Developmental Dynamics**, v. 240, p. 2002-2010, 2011.

NANAZAWA, F.; NAGAI, H.; SHIN, M.; SHENG, G. Negative regulation of primitive hematopoiesis by the FGF signaling pathway. **Blood**, v. 108, n. 10, p. 3335-3343, 2006.

OJKIC, D.; KRELL, P. J.; TUBOLY, T.; NAGY, E. Characterization of fowl adenoviruses isolated in Ontario and Quebec, Canada. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 72, p. 236-241, 2008.

ONO, M.; OKUDA, Y.; SHIBATA, I.; SATO, S.; OKADA, K.; Reproduction of adenoviral gizzard erosion by the horizontal transmission of fowl adenovirus serotype 1. **Journal Veterinary Medicine Science**, v. 69, n. 10, p. 1005-1008, 2007.

PALADE, E. A.; KISARY, J.; BENYEDA, Z.; BALKÁ, G.; JAKAB, C.; VEGH, B.; DEMETER, Z.; RUSVAI, M. Naturally occurring parvoviral infection in Hungarian broiler flocks. **Avian Pathology**, v. 40, n. 2, p. 191-197, 2011.

PANTIN-JACKWOOD, M. J.; SPACKMAN, E.; DAY, J. M.; RIVES, D. Periodic monitoring of commercial turkeys for enteric viruses indicates continuous presence of astrovirus and rotavirus on the farms. **Avian Diseases**, v. 51, p. 674-680, 2007.

PANTIN-JACKWOOD, M. J.; SPACKMAN, E.; 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.; STROTHER, K. O.; MUNDT, E.; DAY, J. M.; SPACKMAN, E. Molecular characterization of avian astroviruses. **Archives of Virology**, v. 156, p. 235-244, 2011.

PANTIN-JACKWOOD, M. J., DAY, J. D.; 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.

PATTON, J. T. Structure and function of the rotaviruses RNA-binding proteins. **Journal of General Virology**, v. 76, p. 2633-2644, 1995.

REYNOLDS, D. L. Enteric viruses. In: SWAYNE-CHAIRMAN, D. E.; GLISSON, J. R.; JACKWOOD, M. W.; PEARSON, J. E.; REED, W. M. **A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens**. 4. ed. Florida State: Rose Printing, 1998. p. 175-184.

REYNOLDS, D. L.; SCHULTZ-CHERRY, S. L. Astrovirus infections. In: SAIF, Y. M.; FADLY, A. M.; GLISSON, J. R.; McDOUGALD, L. R.; NOLAN, L. K.; SWAYNE, D. E. **Diseases of Poultry**. 12. ed. Iowa State: Blackwell, 2008. p. 351-355.

ROSENBERGER, J. K. Reovirus infections. In: SAIF, Y. M.; BARNES, H. J.; GLISSON, J. R.; FADLY, A. M.; McDOUGALD, L.R.; SWAYNE, D. E. **Disease of Poultry**. 11. ed. Iowa State: Blackwell, 2003. p. 283.

ROSENBERGER, J. K.; OLSON, N. O.; HEIDE, L. V. D. Viral arthritis/tenosynovitis and other reovirus infections. In: SWAYNE-CHAIRMAN, D. E.; GLISSON, J. R.; JACKWOOD, M. W.; PEARSON, J. E.; REED, W. M. **A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens**. 4. ed. Florida State: Rose Printing, 1998. p. 207-210.

SANTOS, R. A. T.; CARDOSO, D. P. Astrovirus- revisão. **Revista de Patologia Tropical**, v. 34, n. 3, p. 161-174, 2005.

SAVAGE, C. E.; JONES, R. C. The survival of avian reoviruses on materials associated with the poultry house environment. **Avian Pathology**, v. 32, n. 4, p. 419-425, 2003.

SCHAT, K. A.; PURCHASE, G. Cell-culture methods. In: SWAYNE, D. E.; GLISSON, C. J. R.; JACKWOOD, M. W.; PEARSON, J. E.; REED, W. M. **A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens**. 4. ed. The American Association of Avian Pathologists: University of Pennsylvania, 1998. p. 223-234.

SCHIFF, L. A.; NIBERT, M. L.; TYLER, K. L. Orthoreoviruses and their replication. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. **Fields Virology**. 5 Ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2007. p.1854-1915.

SCHULTZ-CHERRY, S.; KING, D. J.; KOCI, M. D. Inactivation of an astrovirus associated with poult enteritis mortality syndrome. **Avian Diseases**, v. 45, p. 76-82, 2001.

SCHUMANN, T.; HOTZEL, H.; OTTO, P.; JOHNE, R. Evidence of interspecies transmission and reassortment among avian group A rotaviruses. **Virology**, v. 386, p. 334-343, 2009.

SENNE, D. A. Virus propagation in embryonating eggs. In: SWAYNE-CHAIRMAN, D. E.; GLISSON, J. R.; JACKWOOD, M. W.; PEARSON, J. E.; REED, W. M. **A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens**. 4. ed. Florida State: Rose Printing, 1998. p. 235-240.

SENTIES-CUE, C. G.; WILLS, R. W.; STAYER, P. A.; BURLESON, M. A.; MAGEE, D. L. Epidemiology and effect on production parameters of an outbreak of inclusion body hepatitis in broilers. **Avian Diseases**, v. 54, p. 74-78, 2010.

SHIRAI, J.; NAKAMURA, K.; SHINOHARA, K.; KAWAMURA, H.; Pathogenicity and antigenicity of avian nephritis isolates. **Avian Diseases**, v. 35, p. 49-54, 1991.

SONGSERM, T.; ROOZELAAR, D. V.; KANT, A.; POL, J.; PIJPERS, A.; HUURNE, A. T. Enteropathogenicity of Dutch and German avian reoviruses in SPF white leghorn chickens and broilers. **Veterinary Research**, v. 34, p. 285-295, 2003.

SPACKMAN, E.; DAY, J. M.; PANTIN-JACKWOOD, M. J. Astrovirus, reovirus, and rotavirus concomitant infection causes decreased weight gain in broad-breasted white poult. **Avian Diseases**, v. 54, p. 16-21, 2010.

STROTHER, K. O.; ZSAK, L. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay to detect chicken parvovirus-specific antibodies. **Avian Diseases**, v. 53, p. 585-591, 2009.

TAKASE, K.; UCHIMURA, T.; YAMAMOTO, M.; YAMADA, S. Susceptibility of embryos and chicks, derived from immunized breeding hens, to avian nephritis virus. **Avian Pathology**, v. 23, p. 117-125, 1994.

TODD, D.; TRUDGETT, J.; McNEILLY, F.; McBRIDE, N.; DONNELLY, B.; SMYTH, V. J.; JEWHRST, H. L.; ADAIR, B. M. Development and application of an RT-PCR test for detecting avian nephritis virus. **Avian Pathology**, v. 39, n. 3, p. 207-213, 2010.

TORO, H.; GONZALEZ, O.; ESCOBAR, C. CERDA, L. MORALES, M. A.; GONZALEZ, C. vertical induction of the inclusion body hepatitis/hydropericardium syndrome with fowl adenovirus and chicken anemia virus. **Avian Diseases**, v. 45, p. 215-222, 2001.

TORO, H.; PRUSAS, C.; RAUE, R.; CERDA, L.; GEISSE, C.; GONZALES, C.; HESS, M. Characterization of fowl adenoviruses from outbreaks of inclusion body hepatitis/hydropericardium syndrome in Chile. **Avian Diseases**, v. 43, p. 262-270, 1999.

TOURIS-OTERO, F.; CORTEZ-SAN MARTIN, M.; MARTINEZ-COSTAS, J.; BENAVENTE, J. Avian reovirus morphogenesis occurs within viral factories and begins with the selective recruitment of σ NS and λ A to μ NS inclusions. **Journal Molecular Biology**, v. 341. p. 361-374, 2004.

TOURIS-OTERO, F.; MARTINEZ-COSTAS, J.; VAKHRINA, V. N.; BENAVENTE, J. Avian reovirus nonstructural protein μ NS forms viroplasm-like inclusions and recruits protein σ NS to these structures. **Journal of Virology**, v. 319, p. 94-106, 2004.

TSAI, H.; TSENG, C.; CHANG, P.; MEI, K.; WANG, S. Genetic variation of viral protein 1 genes of field strains of waterfowl parvoviruses and their attenuated derivatives. **Avian Diseases**, v. 48, p. 512-521, 2004.

URSU, K.; PAPP, H.; KISFALI, P.; RIGO, D.; MELEGH, B.; MARTELLA, V.; BANYAI, K. Monitoring of group A rotaviruses in wild-living birds in Hungary. **Avian Diseases**, v. 55, p. 123-127, 2011.

VIEIRA, S.L. Chicken embryo utilization of egg micronutrients. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 9, n. 1, p. 1-8, 2007.

VILA, J.; ALVAREZ-MARTINEZ, J.; BUESA, J.; CASTILLO, J. Diagnóstico microbiológico de las infecciones gastrointestinales. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 27, n. 7, p. 406-411, 2009.

VILLEGAS, P. Titration of biological suspensions. In: SWAYNE, D. E.; GLISSON, C. J. R.; JACKWOOD, M. W.; PEARSON, J. E.; REED, W. M. **a laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens**. 4. ed. The American Association of Avian Pathologists: University of Pennsylvania, 1998. p. 248-254.

VILLEGAS, P.; LUKERT, P. D. Virus identification and classification. In: SWAYNE, D. E.; GLISSON, C. J. R.; JACKWOOD, M. W.; PEARSON, J. E.; REED, W. M. **A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens**. 4. Ed. The American Association of Avian Pathologists: University of Pennsylvania, 1998. p. 241-247.

WILSON, F. D.; WILLS, R. W.; SENTIES-CUE, C. G.; MASLIN, W. R.; STAYER, P. A.; MAGEE, D. L. High incidence of glomerulonephritis associated with inclusion body hepatitis in broiler chickens: routine histopathology and histomorphometric studies. **Avian Diseases**, v. 54, p. 975-980, 2010.

WOLD, W. S. M.; HORWITZ, M. S. Adenoviruses. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. **Fields Virology**. 5 Ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2007. p. 2397-2436.

XIAO, C.; LIU, R.; SONG, Z.; LIAO, M.; ZHOU, J. Genomic characterization of a proventriculitis-associated infectious bronchitis coronavirus. **Virus Genes**, v. 40, p. 421-422, 2010.

XIE, Z.; QIN, C.; XIE, L.; LIU, J.; PANG, Y.; DENG, X.; XIE, Z.; KHAN, M. I. Recombinant protein-based ELISA for detection and differentiation of antibodies against avian reovirus in vaccinated and non-vaccinated chickens. **Journal of Virological Methods**, v. 165, p. 108-111, 2010.

YASON, C. V.; SCHAT, K. A. Pathogenesis of rotavirus infection in turkey poult. **Avian Pathology**, v. 15, p. 421-435, 1986.

ZHAO, W.; HUA, X. G.; YUAN, C. L.; CUI, L.; SHAN, T. L.; DAI, X. Q.; ZHU, A. L.; YU, Y.; ZHU, C. X.; YANG, Z. B. Sequence analyses of the representative Chinese-prevalent strain of avian nephritis virus in healthy chicken flocks. **Avian Diseases**, v. 55, n. 1, p. 65-69, 2011.

ZSAK, L.; STROTHER, K. O.; DAY, J. M. Development of a polymerase chain reaction procedure for detection of chicken and turkey parvoviruses. **Avian Diseases**, v. 53, p. 83-88, 2009.

ZSAK, L.; STROTHER, K. O.; KISARY, J.; Partial genome sequence analysis of parvoviruses associated with enteric disease in poultry. **Avian Pathology**, v. 37, n. 4, p. 435-441, 2008.