

LUIS FABIAN NÚÑEZ NARANJO

**Caracterização molecular e determinação da patogenicidade de
Astrovírus de Galinha, Vírus da Nefrite Aviária e Parvovírus de
Galinha isolados de aves comerciais com problemas entéricos no
Brasil**

São Paulo
2015

LUIS FABIAN NÚÑEZ NARANJO

**Caracterização molecular e determinação de patogenicidade de
Astrovírus de Galinha, Vírus da Nefrite Aviária e Parvovírus de
Galinha isolados de aves comerciais com problemas entéricos no
Brasil**

Tese 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 Doutor em Ciências

Departamento:

Patologia

Área de Concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientador:

Prof. Dr. Antonio José Piantino Ferreira

São Paulo

2015

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.3209
FMVZ

Núñez Naranjo, Luis Fabian

Caracterização molecular e determinação da patogenicidade de Astrovírus de Galinha, Vírus da Nefrite Aviária e Parvovírus de Galinha isolados de aves comerciais com problemas entéricos no Brasil / Luis Fabian Núñez Naranjo. -- 2015.

76 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2015.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Prof. Dr. Antonio José Piantino Ferreira.

1. Vírus entéricos. 2. caracterização molecular. 3. Astrovírus. 4. Parvovírus. 5. RSS.
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 "Caracterização molecular e determinação da patogenicidade de Astrovírus de Galinha, Vírus da Nefrite Aviária e Parvovírus das Galinhas isolados de aves comerciais com problemas entéricos no Brasil", protocolado sob o nº 2569/2012, utilizando 450 (quatrocentos e cinquenta) galinhas, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Antonio José Piantino Ferreira, foi aprovado em de 15/2/2012 e 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.

We certify that the Research "Molecular Characterization and Pathogenicity Determination of Chicken Astrovirus, Avian Nephrite Virus and Chicken Parvovirus Isolated from Commercial Flocks with Enteric Problems in Brazil", protocol number 2569/2012, utilizing 450 (four hundred and fifty) chickens, under the responsibility Maria Angélica Miglino, was approved in the meeting of day 2/15/2012 and 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.

São Paulo, 6 de agosto de 2015.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: NUÑEZ NARANJO, Luis Fabian

Título: **Caracterização molecular e determinação da patogenicidade de Astrovírus de Galinha, Vírus da Nefrite Aviária e Parvovírus de Galinha isolados de aves comerciais com problemas entéricos no Brasil**

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

Data: __/__/__

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

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, fue un largo camino, pero siempre estuviste ahí.

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 y 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.

Para mi abu Don Luis que se que estaría muy feliz con este logro, nos veremos luego.

A mi Joaquín, Danielita, Pedro y próximamente Matías que desde que los conocí los 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.

À Prof. Dra. Maria Lucia Zaidan Dagli, e ao pessoal do laboratório de Oncologia Experimental e Comparada da FMVZ-USP pela facilidade no uso das instalações e dos equipamentos para levar a cabo este trabalho.

À Prof. Dra. Lilian Marques de Sá pela facilidade no uso das instalações do seu laboratório e pela grande ajuda na leitura e análise do material histopatológico, muito obrigado professora pela amizade e confiança.

Ao Lucas um colega e sobre todo um grande amigo que me ajudou sempre que precisei na consecução deste trabalho muito obrigado Lucas

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

A Silvana pela ajuda e apoio durante todo o trabalho.

Ao Marcos Buin pelo apoio e facilitação do equipamento utilizado no presente trabalho.

A Marcia Catroxo pelo apoio e colaboração.

Ao Dennis um grande amigo muito obrigado pelo apoio e ajuda quando necessário muito obrigado Denão.

Aos meus colegas e amigos de Laboratório Little Lu, Natalia e Claudia pela amizade apoio e convivência. Ao Mauricio pela ajuda no preparo de todos os materiais e insumos que foram usados no presente trabalho.

A Vera uma grande amiga, obrigado pela ajuda, e apoio.

Meu mais profundo agradecimento à Prof. Claudete pela ajuda extraordinária na correção deste texto, de todo coração muito obrigado, voce fez possível a realização deste trabalho, muito obrigado.

Um profundo agradecimento também ao Prof. Antonio Jose Piantino Ferreira pelo apoio na consecução do presente trabalho que a pesar da falta de apoio financeiro, fez possível o andamento do trabalho muito obrigado professor, acho q deu certo.

Ao CAPES e à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, pela confiança e ajuda concedida para a realização deste doutorado.

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

William Blake

RESUMO

NÚÑEZ NARANJO, L. F. Caracterização molecular e determinação da patogenicidade de Astrovírus de Galinha, Vírus da Nefrite Aviária e Parvovírus de Galinha isolados de aves comerciais com problemas entéricos no Brasil. [Molecular characterization and determination of pathogenicity of Chicken Astrovirus, Avian Nephritis Virus and Chicken Parvovirus isolated from chicken commercial flocks with enteric problems in Brazil]. 2015. 76 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

As doenças entéricas apresentam uma grande importância na saúde das aves. Astrovírus de galinha (*CAstV*), vírus da nefrite aviária (*ANV*) e parvovírus de galinha (*ChPV*) são vírus que foram relacionados com problemas entéricos em lotes comerciais de galinhas, sendo identificados em galinhas com sintomas de doença entérica. Existem poucas informações relacionadas a estes três vírus que estão sendo investigados como causadores de problemas entéricos, especialmente de diarreia, sintoma relacionado com a síndrome do nanismo e perda de ganho de peso nas granjas avícolas. Os objetivos do presente trabalho foram: a) realizar a caracterização molecular destes vírus; b) determinar a patogenicidade do *ChPV*, *CAstV* e *ANV* isolados de galinhas com doença entérica. As técnicas moleculares para a caracterização molecular dos vírus, para a detecção e quantificação das partículas virais foram utilizadas, e a análise histopatológica foi utilizada para a avaliação das lesões. Pintinhos *SPF* de um dia de idade foram divididos em quatro (04) grupos, cada grupo recebeu um dos três vírus isolados e o grupo restante foi usado como controle negativo. Os animais foram mantidos por 42 dias com água e ração *ad libitum* em isoladores individuais para cada grupo, a cada sete (07) dias foram obtidas amostras de intestino. Os três grupos infectados apresentaram após 12 horas da infecção, sinais de doença entérica, como: depressão, sonolência, penas eriçadas e principalmente diarreia. Após 10 dias da inoculação era evidente a desuniformidade no tamanho dos animais, com a presença de animais com nanismo. A avaliação macroscópica das aves mostrou a presença de intestinos distendidos, cheios de gás e líquido. O exame microscópico diferenciou o grupo infectado com *ChPV* dos demais, ocorrendo microabscessos de cripta, células em necrose com distribuição multifocal, e enterite linfoplasmocítica discreta. Os dois grupos restantes mostraram uma discreta hiperplasia

de cripta e enterite linfoplasmocítica. Para cada um dos grupos de aves infectados foram estabelecidos ensaios de PCR em tempo real (qPCR), que detectaram que os três grupos de aves experimentais eram positivos (100%) para seu correspondente vírus com a maior carga viral aos sete dias de idade, diminuindo drasticamente após 21 dias de idade, no entanto, continuando presente até o 42º dia de idade. O grupo controle negativo não apresentou a presença de vírus, nenhum dos sintomas ou lesões. O peso dos animais em cada grupo infectado diminuiu levemente em comparação ao grupo controle negativo, mas sem diferença estatística significativa ($p > 0,05$). A caracterização molecular e a análise filogenética dos vírus estudados determinou que a cepa de *CAstV* pertencia ao grupo I dos *CAstV* e se relaciona com as cepas que estão circulando nos USA. A cepa de *ANV* pertence ao grupo *ANV-1* e apresentou maior porcentagem de similaridade com a cepa do Japão. A cepa do *ChPV* foi classificada no grupo do isolado da Hungria. Os resultados do presente trabalho caracterizaram o *CAstV* como parte do Grupo I, o *ANV* como um *ANV-1* e o *ChPV* como parte do grupo do isolado da Hungria e mostraram que as cepas de *ChPV*, *ANV* e *CAstV* estudadas produzem doença entérica

Palavras-chave: vírus entéricos. caracterização molecular. Astrovírus. Parvovírus. RSS.

ABSTRACT

NÚÑEZ NARANJO, L. F. **Molecular characterization and determination of pathogenicity of Chicken Astrovirus, Avian Nephritis Virus and Chicken Parvovirus isolated from chicken commercial flocks with enteric problems in Brazil.** [Caracterização molecular e determinação da patogenicidade de Astrovírus de Galinha, Vírus da Nefrite Aviária e Parvovírus de Galinha isolados de aves comerciais com problemas entéricos no Brasil]. 2015. 76 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Enteric diseases are of great importance in the health of birds. Chicken astrovirus (CAstV), avian nephritis virus (ANV) and chicken parvovirus (ChPV) are viruses that have been associated with enteric problems in chickens commercial flocks, being identified in chickens with symptoms of enteric disease. There is little information regarding these three viruses that are being investigated as the cause of enteric problems, especially diarrhea, symptoms related to runting stunting syndrome in poultry. This work aims to perform molecular characterization and determine the pathogenicity of ChPV, CAstV and ANV isolated from chickens with enteric disease. A multidisciplinary approach was used as molecular techniques for the molecular characterization of the viruses for the detection and quantification of the viral particles, histopathological analysis was used for evaluation of the lesions. Chicks SPF one day of age were divided into four (04) groups and each group received one of the three virus isolates and the remaining group was used as negative control, the animals were maintained for 42 days with water and food *ad libitum* in individual isolators for each group, every seven (07) days intestine samples were obtained. The three infected groups showed after 12 hours of infection, signs of enteric diseases, such as depression, drowsiness, ruffled feathers and mainly diarrhea. After 10 days of inoculation was evident non-uniformity in size of the animals, and the presence of animals with dwarfism. Macroscopic evaluation of the animals showed the presence of distended intestines filled with gas and liquid. Microscopic examination differentiated the group infected with ChPV the other two groups, showing abscess crypt cells in necrosis with multifocal distribution, and discreet linfoplasmocitic enteritis. The remaining two groups showed slight crypt hyperplasia and a discrete linfoplasmocít enteritis. For each of the infected groups real time PCR (qPCR)

assays were established, showing the three experimental groups positive (100%) to its corresponding virus and most viral load to seven day old decreasing sharply after 21 days age, however this continuing until 42 days of age. The negative control group showed no viruses, no symptoms or injuries. The weight of the animals in each infected group dropped slightly compared to the negative control group, but without significant difference ($p > 0.05$). Molecular characterization and phylogenetic analysis of the studied viruses determined that the CAstV strain studied belong to group I of CAstV and is related to the strains that are circulating in the USA. The ANV strain belongs to ANV-1 group and showed a higher percentage of similarity with the Japanese strain. The ChPV strain belongs to group of isolated of Hungary. The results of this study characterized the CAstV as part of Group I, ANV as a ANV-1 and ChPV as a part of group of isolated of Hungary, showed that the strains of ChPV, ANV and CAstV studied produce enteric disease

Key words: enteric viruses. molecular characterization. Astrovirus. Parvovirus. RSS.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	MATERIAIS E MÉTODOS	19
2.1	AMOSTRAS VIRAIS.....	19
2.2	CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR	19
2.2.1	Suspensão viral.....	19
2.2.2	Extração do DNA e RNA viral.....	20
2.2.3	Caracterização molecular de um fragmento do gene <i>ORF 1b</i> e <i>ORF 2</i> de astrovírus de galinha (<i>CAstV</i>), de um fragmento do gene <i>ORF 1b</i> do vírus da nefrite aviária (<i>ANV</i>) e de um fragmento do gene <i>VP1-PV2</i> do parvovírus de galinha (<i>ChPV</i>) por seqüenciamento do cDNA e DNA.....	20
2.2.4	Seqüenciamento do DNA (<i>ChPV</i>) e cDNA (<i>CAstV</i> e <i>ANV</i>) amplificado.....	22
2.2.5	Edição e análise das seqüências.....	22
2.3	PADRONIZAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE UMA REAÇÃO DE RT-PCR EM TEMPO REAL (RT-qPCR) PARA A DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE UM FRAGMENTO DO GENE <i>ORF 1b</i> DO ASTROVÍRUS DE GALINHA (<i>CAstV</i>) E DO GENE <i>UTR</i> DO VÍRUS DA NEFRITE AVIÁRIA (<i>ANV</i>) e qPCR PARA A DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE <i>CHPV</i>	23
2.3.1	Técnica da Transcriptase Reversa da Reação em Cadeia pela Polimerase em tempo real (RT-qPCR).....	25
2.3.2	Técnica da Reação em Cadeia pela Polimerase em tempo real (qPCR).....	26
2.3.3	Determinação da sensibilidade e da curva padrão da RT-qPCR em tempo real para a quantificação viral de <i>ANV</i> e <i>CAstV</i> e determinação da curva padrão da qPCR em tempo real para a quantificação viral de <i>ChPV</i>	26
2.4	AVES, ALOJAMENTO E ALIMENTAÇÃO.....	27

2.4.1	Vírus	27
2.4.2	Inoculo	27
2.5	DELINEAMENTO E INFECÇÃO EXPERIMENTAL	28
2.6	AMOSTRAGEM, CONSERVAÇÃO E PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS.....	28
2.6.1	Detecção e quantificação viral.....	29
2.6.2	Histopatologia	29
2.6.2	Avaliação das lesões microscópicas	29
2.7	ANÁLISE DOS DADOS.....	31
3	RESULTADOS	32
3.1	CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR.....	32
3.2	PADRONIZAÇÃO DE UMA REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE EM TEMPO REAL (qPCR) PARA A DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO <i>CHPV</i>	42
3.3	PADRONIZAÇÃO DE UMA REAÇÃO DE TRANSCRIÇÃO REVERSA DA REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE EM TEMPO REAL (RT-qPCR) PARA A DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO <i>CASTV</i>	43
3.4	PADRONIZAÇÃO DE UMA REAÇÃO DE TRANSCRIÇÃO REVERSA DA REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE EM TEMPO REAL (RT-qPCR) PARA A DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO <i>ANV</i>	44
3.5	INFECÇÃO EXPERIMENTAL.....	45
3.5.1	Sinais clínicos.....	45
3.5.2	Avaliação macroscópica	47
3.5.3	Avaliação microscópica	49
3.5.4	Detecção e quantificação viral.....	57
3.5.5	Peso dos animais.....	59
4	DISCUSSÃO	60
5	CONCLUSÕES	68
	REFERÊNCIAS	70

1 INTRODUÇÃO

As doenças entéricas assumem grande importância na saúde animal, pois a saúde do intestino interfere no bem estar do indivíduo (DAY; ZSAK, 2013). Muitos agentes causadores de doença como: parasitas, bactérias e vírus foram associados com as doenças entéricas (DAY et al., 2015). Coronavírus, adenovírus, parvovírus, rotavírus, reovírus e astrovírus foram relacionados com surtos de doença entérica em diferentes espécies de animais, ou seja, a felinos, a ratos, a caninos, a bovinos, a visão e até a humanos, afetando principalmente os jovens (MAONDEZ; ARIAS, 2007). Na avicultura, as doenças entéricas apresentam um papel fundamental e se constituem um grande problema econômico pela baixa conversão alimentar, baixo ganho de peso e mortalidade (PANTIN-JACKWOOD et al., 2008; SPACKMAN; DAY; PANTIN-JACKWOOD, 2010).

Vários vírus entéricos foram identificados e relacionados com doenças entéricas, tanto nas aves comerciais como nos mamíferos. Astrovírus, parvovírus, rotavírus, adenovírus e coronavírus foram descritos como agentes causadores de doença entérica (GUY, 1998; PANTIN-JACKWOOD et al., 2007; DAY; ZSAK, 2013; MOURA-ALVAREZ et al., 2013; NUÑEZ; PIANTINO FERREIRA, 2013; METTIFOGO et al., 2014). Agentes virais foram associados com as síndromes entéricas, como a Síndrome do Nanismo e Retardo do Crescimento (*RSS*) em galinhas e em perus, a Síndrome Entérica dos Perus (PEC) (SMART et al., 1988; OTTO et al., 2006; KANG et al., 2012; ZSAK et al., 2013). Estas síndromes causam problemas entéricos e foram associadas, principalmente, com sinais clínicos de apatia, sonolência, debilidade, penas eriçadas, nanismo e diarreia (KISARY; NAGY; BITAY, 1984; KOCI et al., 2003; JINDAL et al., 2010; NIGHOT et al., 2010; KANG et al., 2012; DAY; ZSAK, 2013; ZSAK et al., 2013; SCHULTZ-CHERRY et al., 2015). Assim, a indústria avícola tem reportado com maior frequência surtos relacionados com estas síndromes (GUY, 1998; PANTIN-JACKWOOD et al., 2007, 2008; DAY; ZSAK, 2013; MOURA-ALVAREZ et al., 2013; ZSAK et al., 2013).

Astrovírus é um vírus RNA que foi relacionado a surtos de diarreia em animais jovens, é um vírus pequeno, não envelopado, com 28-30nm de diâmetro, possui um genoma de 6,8 a 7,9 Kb de extensão, de fita simples, que inclui uma região 5' não traduzida (*UTR*), seguida de três estruturas abertas de leitura (*ORFs*), uma região 3' não traduzida e uma cauda *poly-A* (KOCI; SCHULTZ-CHERRY, 2002; DE BENEDICTIS et al., 2011). A família *astroviridae* se divide em dois gêneros: Mamastrovírus (astrovírus dos mamíferos) e Avastrovírus (astrovírus aviários) (MAONDEZ; ARIAS, 2007). Entre os astrovírus aviários foram identificados os astrovírus dos perus (*TAsV-1* e *TAsV-2*), o astrovírus dos patos (*DAstV*), o vírus da nefrite aviária (*ANV*) (IMADA; YAMAGUCHI; KAWAMURA, 1979) e o astrovírus de galinha (*CAstV*) (PANTIN-JACKWOOD et al., 2011).

CAstV foi identificado pela primeira vez por Spackman et al., em 1984, como um enterovírus *like*, e caracterizado como *CAstV* por Baxendale, Mebatsion, em 2004. *CAstV* possui um genoma RNA de 6,5 a 7,5 Kb, de fita simples, que codifica as mesmas regiões descritas acima, porém geneticamente distintas (SMYTH et al., 2009, SMYTH et al., 2012). *CAstV* foi relacionado a problemas entéricos, em galinhas de diferentes idades e em pintinhos, foi detectado desde o primeiro dia de vida (PANTIN-JACKWOOD et al., 2007; SMYTH et al., 2009; TODD et al., 2009; KOO et al., 2013; METTIFOGO et al., 2014). *CAstV* pode causar sinais graves de doença entérica caracterizada, principalmente, pela presença de diarreia (KOCI et al., 2003; BAXENDALE; MEBATSION, 2004; KANG et al., 2012).

ANV também pertence ao gênero avastrovírus, é um vírus RNA, de fita simples, que possui um genoma de 7,0 Kb. *ANV* foi identificado pela primeira vez por YAMAGUCHI; IMADA e KAWAMURA em 1977, sendo classificado como um picornavírus, após a caracterização molecular do vírus foi reclassificado como um astrovírus (IMADA et al., 2000), e como seu nome sugere foi relacionado a problemas renais (IMADA et al., 1981; NARITA et al., 1990; SHIRAI et al., 1991). No entanto, foi identificado por PCR no conteúdo intestinal de aves apresentando sinais de problemas entéricos (PANTIN-JACKWOOD et al., 2008; HEWSON; O'ROURKE; NOORMOHAMMADI, 2010; SMYTH et al., 2010; KANG et al., 2012; METTIFOGO et

al., 2014). A doença clínica em pintinhos pode variar de uma apresentação subclínica até os sintomas de *RSS* e nefropatias (IMADA et al., 1981; SHIRAI et al., 1990; PANTIN-JACKWOOD et al., 2008; TODD et al., 2010; KANG et al., 2012), porém o impacto do vírus nas doenças entéricas permanece desconhecido (DE BENEDICTIS et al., 2011). Dois sorotipos de *ANV* foram identificados, o *ANV-1* e o *ANV-2* (SHIRAI et al., 1991). Este vírus está amplamente distribuído no mundo todo, nos lotes de galinhas comerciais, sendo encontrado também em perus (PANTIN-JACKWOOD et al., 2008; MOURA-ALVAREZ et al., 2013; JACUKOWICZ et al., 2014; METTIFOGO et al., 2014).

Assim como os astrovírus, os membros da família *Parvoviridae* infectam uma ampla variedade de animais, especialmente os jovens, produzindo doença entérica, cuja sintomatologia principal é a diarreia (HUEFFER; PARRISH, 2003). Parvovírus são vírus pequenos e não envelopados, com uma fita simples de DNA e um genoma de 5,0 Kb, que codifica quatro (04) proteínas estruturais (*VP1 a VP4*) e uma proteína não estrutural (*NS*) (BERNS, K.; PARRISH, 2007). Em aves comerciais, o parvovírus de galinha (*ChPV*) e o parvovírus dos perus (*TuPV*) estão relacionados com doença entérica afetando pintinhos desde os primeiros dias de idade (ZSAK et al., 2009, 2013; METTIFOGO et al., 2014; NUÑEZ et al., 2015a). *ChPV* foi identificado pela primeira vez em aves jovens apresentando diarreia (KISARY; NAGY; BITAY, 1984). Infecções experimentais com *ChPV* mostraram uma marcada diminuição no desenvolvimento da ave e os sinais clínicos de doença entérica, como diarreia (KISARY, 1985; ZSAK et al., 2013). *ChPV* foi descrito em vários países do mundo, associados com surtos de doença entérica e mortalidade (PALADE et al., 2011; DOMANSKA-BLICHARZ et al., 2012; TARASIUK; WOŹNIAKOWSKI; SAMOREK-SALAMONOWICZ, 2012).

Em geral, as doenças entéricas se caracterizam pela presença de diarreia, sendo que as principais lesões histopatológicas descritas estão localizadas no intestino delgado, caracterizadas por enterite e enteropatia cística (OTTO et al., 2006; KANG et al., 2012).

No Brasil, nos últimos anos foram descritos surtos de doença entérica onde *ChPV*, *CAstV* e *ANV* foram identificados por técnicas moleculares mostrando que estes

vírus estão circulando nos lotes comerciais de galinhas (METTIFOGO et al., 2014). Como o isolamento deste vírus é um procedimento de difícil execução o seu estudo se tornou difícil e o seu papel na patogênese das doenças entéricas desconhecido (KISARY et al., 1985; PANTIN-JACKWOOD et al., 2011). *CAstV*, *ANV* e *ChPV* foram isolados em ovos embrionados de galinha *SPF* a partir de amostras de aves com problemas digestivos (NUÑEZ, 2012; NUÑEZ et al., 2015; NUÑEZ et al., 2015).

O estudo do envolvimento destes vírus nas doenças entéricas ajudará no entendimento da sua patogênese. O presente trabalho teve como objetivo a caracterização molecular e a determinação da patogenicidade de cepas de astrovírus de galinha, vírus da nefrite aviária e parvovírus de galinha isolados a partir de amostras de galinhas com doença entérica no Brasil.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 AMOSTRAS VIRAIS

No presente trabalho foram utilizadas amostras contendo apenas um dos seguintes vírus: astrovírus de galinha (*CAstV*), vírus da nefrite aviária (*ANV*) e parvovírus de galinha (*ChPV*), isolados a partir de amostras fecais e intestinais de galinhas com doença entérica (NUÑEZ, 2012; NUÑEZ et al., 2015a, NUÑEZ et al., 2015b) e se encontram armazenados no Laboratório de Ornitopatologia (LABOR) da FMVZ-USP. (Quadro 1).

Quadro 1- Identificação dos isolados virais

Vírus isolado	Identificação da amostra	Identificação usada nas árvores filogenéticas	Referência
CAstV	358-2	USP-30	(NUÑEZ et al., 2015b)
ANV	400-2	USP-9	(NUÑEZ, 2012)
ChPV	362-3	USP-66	(NUÑEZ et al., 2015a)

Fonte: (NUÑEZ, L. F. N., 2015)

2.2 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

2.2.1 Suspensão viral

Uma alíquota das amostras, previamente maceradas (embrião), foi colocada em microtubo contendo tampão fosfato salino (PBS) 0,1 M, pH 7,4. As amostras foram congeladas a -80°C por 10 minutos, submetidas a 56°C por um (01) minuto para seu descongelamento e homogeneizadas em *vortex* por 20 segundos. Este procedimento

foi repetido por três vezes. As amostras foram centrifugadas a 12.000 x g por 30 minutos a 4°C.

2.2.2 Extração do DNA e RNA viral

O DNA ou RNA viral foram extraídos de 250 µL do sobrenadante da suspensão viral acima descrita usando o reagente TRIzol (Invitrogen by Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), segundo as instruções do fabricante.

2.2.3 Caracterização molecular de um fragmento do gene *ORF 1b* e *ORF 2* de astrovírus de galinha (*CAstV*), de um fragmento do gene *ORF 1b* do vírus da nefrite aviária (*ANV*) e de um fragmento do gene *VP1-VP2* do parvovírus de galinha (*ChPV*) por sequenciamento do cDNA ou do DNA

Para a caracterização molecular dos vírus, reações de RT-PCR e PCR em ponto final foram desenvolvidas. Os *primers* e as condições da reação do RT-PCR ocorreram de acordo com as descrições de Smyth et al (2009) para *CAstV*, enquanto para *ANV* segundo as descrições de Day; Spackman e Pantin-Jackwood (2007), com algumas modificações.

O RNA extraído foi submetido a uma reação de transcrição reversa (RT). Foram utilizados 3,5 µL de RNA extraído para 6,5 µL de *mix* de reação que continha 2,0 µL de tampão 10X, 1,0 µL de deoxinucleotídeo trifosfato (dNTPs) 10 mM, 1,0 µL de DTT, 0,5 µL de enzima M-MLV (Invitrogen by Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) e 1,0 µL de cada um dos *primers* senso e antisense. 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 de 23 µL de *mix* que

continha: 0,5 μM de cada um dos *primers* senso e antisenso, 2,5 μL de tampão 10X, 4,0 μL de dNTPs 1,25 mM, 37,5 mM de MgCl_2 e 1,0U de TaqDNA polimerase Platinum (Invitrogen by Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) e 2,0 μL de cDNA. A reação de amplificação ocorreu nas seguintes condições: um ciclo térmico de 94°C por 3 minutos, seguido de 30 ciclos de temperaturas de 94°C por um minuto, 56°C por um minuto, 72°C por um minuto, seguida de 72°C, por 10 minutos. A reação foi mantida a 4°C ao infinito, até se armazenar os produtos amplificados a -20°C.

Para *ChPV* os *primers* e as condições da reação do PCR ocorreram segundo as descrições de Carratalà et al (2012). Na reação de PCR se utilizou 23 μL de *mix* de reação que continha: 0,5 μM de cada um dos *primers* senso e antisenso, 2,5 μL de tampão 10X, 4,0 μL de dNTPs 1,25 mM, 37,5 mM de MgCl_2 e 1,0 U de TaqDNA polimerase Platinum, (Invitrogen by Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) e 2,0 μL de DNA. A reação de amplificação ocorreu nas seguintes condições: 94°C por 3 minutos e 30 ciclos de temperaturas 94°C por um minuto, 55°C por um minuto, 72°C por um minuto, seguida de 72°C, por 10 minutos. A reação foi mantida a 4°C ao infinito, até se armazenar os produtos amplificados a -20°C. O Quadro 2 mostra os *primers*, a sequência de nucleotídeos, o produto amplificado e as referências usadas na reação de PCR de ponto final.

Os produtos amplificados (510 pb *CAstV*, 473 pb *ANV* e 435 pb *ChPV*) foram submetido à eletroforese em gel de agarose 1,5%. As amostras foram coradas com *Sybr Safe* (Invitrogen). Foi utilizado o marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen). O resultado foi analisado por meio de um transiluminador e foto documentado por *Alpha Imager Mini Análises System* (Alpha InnotechCorp., San Leandro, CA).

Quadro 2 - *Primers*, sequência de nucleotídeos, produto amplificado (pb) e referências dos vírus entéricos usados para a caracterização molecular.

Vírus	Primer	Gene	Sequência de nucleotídeos (5' - 3')	(pb)	Referência
<i>CAstV</i>	<i>CAstV-for</i> <i>CAstV-rev</i>	<i>ORF 1b/</i> <i>ORF 2</i>	KCA TGG CTY CAC CGY AAD CA CGG TCC ATC CCT CTA CCA GAT TT	510	(SMYTH et al., 2009)
<i>ANV</i>	ANV Pol 1F ANV Pol 1R	<i>ORF 1b</i>	GYTGGGCGCYTCYTTTGAYAC CRTTTGCCCKRTARTCTTTRT	472	(DAY; SPACKMAN; PANTIN- JACKWOOD, 2007)
<i>ChPV</i>	VP 1F VP 1R	<i>VP1/VP2</i>	TGGAATTGTGATACTATATGGG TCYTGATCTGCAAATATTG	373	(CARRATALÀ et al., 2012)

Fonte: (NÚNEZ, L. F. N., 2015)

2.2.4 Sequenciamento do DNA (*ChPV*) e do cDNA (*CAstV* e *ANV*) amplificado

Os fragmentos amplificados foram purificados usando o *kit* GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) seguindo as recomendações do fabricante. Cada produto purificado foi sequenciado no sentido senso e antisenso usando o *kit* Big Dye Terminator Version 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems by Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). As reações de sequenciamento foram realizadas em um *ABI 3730 DNA Analyzer* (Applied Biosystems by Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

2.2.5 Edição e análise das sequências

Após o processo de sequenciamento e leitura das sequências, as amostras foram editadas e alinhadas usando os *softwares* *CLC Main Workbench 7.0.2e* *Bioedit* versão 7.1.3 *Biological Sequence Alignment Editor* (*Ibis Biosciences*). As sequências geradas dos vírus estudados foram analisadas usando a ferramenta *BLAST* para se determinar a similaridade das sequências com aquelas depositadas no *GeneBank*. As sequências de nucleotídeos obtidas de cada um dos vírus estudados foram alinhadas e

comparadas com outras sequências do mesmo vírus de outras partes do mundo usando o método *CLUSTAL W* disponível no ClustalX 2.0.11 *Package software* (European Bioinformatics Institute Saffron Walden CB10 1SD, Reino Unido). A árvore filogenética foi inferida usando o método estatístico e teste de filogenia *Maximum Likelihood* junto com o modelo de substituição *General Time Reversible Model* com 1000 *bootstraps* de replicação integrado no programa *MEGA 5* (Center for Evolutionary Functional Genomics – The Biodesign Institute, USA – Free Use) (TAMURA et al., 2011).

2.3 PADRONIZAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE UMA REAÇÃO DE RT-PCR EM TEMPO REAL (RT-qPCR) PARA A DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE UM FRAGMENTO DO GENE *ORF 1b* DO ASTROVÍRUS DE GALINHA (*CAstV*), DO GENE *UTR* DO VÍRUS DA NEFRITE AVIÁRIA (*ANV*) E PCR EM TEMPO REAL (qPCR) PARA A DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE UM FRAGMENTO DO GENE *NS* DE *ChPV*

Para a padronização e desenvolvimento de uma reação de RT-qPCR para *CAstV*, *ANV* e de qPCR para *ChPV* foi necessário realizar uma reação de PCR de ponto final para cada um dos vírus estudados. Os *primers* e as condições descritas por Day; Spackman e Pantin-Jackwood (2007) foram usados para a amplificação de *CAstV*, os *primers* e as condições descritas por Todd et al. (2010) para a amplificação de *ANV* e os *primers* e as condições descritas por Zsak et al. (2009) para a amplificação de *ChPV*. As condições usadas para a reação de transcrição reversa foram as mesmas descritas no item 2.2.3. Na reação de PCR foram utilizados 23 µL de reação que continha: 0,5 µM de cada um dos *primers* senso e antiseno (de acordo com o Quadro 3), 2,5 µL de tampão 10X, 4,0 µL de dNTPs 1,25 mM, 37,5 mM de MgCl₂ e 1,0 U de Taq DNA polimerase Platinum (Invitrogen by Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) e 2,0 µL de cDNA. A reação de amplificação ocorreu nas seguintes condições: um ciclo térmico de 94°C por 3 minutos, 30 ciclos de temperaturas de 94°C

por um minuto, 56°C por um minuto, 72°C por um minuto, seguida de 72°C, por 10 minutos. O Quadro 3 mostra os *primers*, a sequência de nucleotídeos, os produtos amplificados e as referências usadas nas reações de RT-qPCR e qPCR.

Os produtos gerados após as amplificações foram inseridos, individualmente, em um vetor PcrTM 2.1-TOPO (Invitrogen by Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), transformados e clonados em células competentes *E. coli* TOP 10 de acordo com as instruções do fabricante. O produto amplificado para *CAstV* possuía 362 pb, para *ANV* possuía 182 pb e para *ChPV* possuía 561 pb.

Para a comprovação de que o produto de PCR foi clonado, após a transformação e clonagem o plasmídeo (vetor mais inserto) foi extraído usando o *kit QIAprep Spin Miniprep Kit* (QUIAGEN, CA, USA), segundo as instruções do fabricante. O DNA plasmídeo obtido foi submetido a uma reação de PCR de ponto final com os *primers* e condições da reação descritas acima para amplificar o fragmento do gene que foi inserido. O produto obtido foi purificado e sequenciado segundo as condições descritas no item 2.2.4 e as sequências obtidas editadas e analisadas como se descreveu no item 2.2.5. A ferramenta *BLAST* foi utilizada para se determinar a similaridade das sequências obtidas com outras sequências de *CAstV*, *ANV* ou *ChPV* depositadas no *GeneBank*. Com as sequências obtidas foram desenhados *primers* específicos para cada um dos vírus com o programa *CLC Main Workbench 7.0.1*. Para a amplificação por meio de qPCR foram utilizados fragmentos específicos tais como: gene ORF 1b para *CAstV* e gene *NS* do *ChPV* (Quadro 3). Para o *ANV* não foram desenhados *primers* e foram usados aqueles descritos por Todd et al (2010) para a PCR em ponto final e adaptados para uma reação de qPCR (Quadro 3).

Quadro 3 - *Primers*, sequência de nucleotídeos, produto amplificado (pb) e referências dos vírus entéricos usados para a padronização e desenvolvimento das reações de qRT-PCR e qPCR para os vírus estudados.

Vírus	Primer	Gene	Tipo de Reação	Sequência de nucleotídeos (5' - 3')	(pb)	Referência
CAstV	CAstV-for CAstV-rev	ORF 1b	PCR	GAYCARCGAATGCGRAGRTTG TCAGTGGAAGTGGGKARTCTAC	362	(DAY; SPACKMAN; PANTIN-JACKWOOD, 2007)
	Astro AF Astro AR		qPCR	CGCATTTCGGCAGATTAGAT CAATCAAACAATTTCCTTATTAGCC	74	Este Estudo
ANV	ANV Pol 1F ANV Pol 1R	UTR	PCR qPCR	GYTGGGCGCYTCYTTTGAYAC CRTTGGCCCKRTARTCTTTRT	182	(TODD et al., 2010)
ChPV	PVF 1 PVR 1	NS	PCR	TTCTAATAACGATATCACT TTTGCCTTGCGGTGAAGTCTGGCTCG	561	(CARRATALÀ et al., 2012)
	Parvo 1F Parvo 1R		qPCR	GCAACTAACCTGACCGTGTG CCCGGATTCCAGAACCAGTAT	96	Este Estudo

Fonte: (NÚÑEZ, L. F. N., 2015)

2.3.1 Técnica da Transcriptase Reversa da Reação em Cadeia pela Polimerase em tempo real (RT-qPCR)

O RNA extraído foi submetido a uma reação de transcrição reversa (RT), para a obtenção do DNA complementar (cDNA) de acordo com as descrições do item 2.2.3 e foi submetido à reação em cadeia pela polimerase em tempo real (qPCR).

Nas reações de PCR em tempo real foi utilizado o volume final de 20 µL. Cada reação conteve 10 µL de *Fast SYBR Green Master Mix (2X)* (*Applied Biosystems*), 0,5 µM de cada *primer* senso e antisenso, 1,0 µL de cDNA de cada amostra e água destilada livre de nucleases (dH₂O) (*Invitrogen*) até se completar o volume de 20 µL. No controle negativo (NTC – *No Template Control*) o volume de cDNA foi substituído por dH₂O. As reações foram realizadas em um termociclador 7500 *Real-Time PCR System* (*Applied Biosystems*), no modo *fast*, com as seguintes condições: 95°C por 15 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 30 segundos.

2.3.2 Técnica da Reação em Cadeia pela Polimerase em tempo real (qPCR)

A reação de qPCR para *ChPV* continha um volume total de 20 μ L por reação. Cada reação possuía 10 μ L de *Fast SYBR Green Master Mix (2X)* (*Applied Biosystems*), 0,5 μ M de cada *primer* senso e antisenso, 1,0 μ L de DNA de cada amostra ou do DNA extraído do controle positivo e água destilada livre de nucleases (dH₂O) (*Invitrogen*) até se completar o volume de 20 μ L. No controle negativo (NTC – *No Template Control*) o volume de DNA foi substituído por dH₂O. As reações foram realizadas em um termociclador *7500 Real-Time PCR System* (*Applied Biosystems*), no modo *fast*. As condições de temperatura e ciclos utilizados foram os mesmos que estão descritos no 2.3.1.

2.3.3 Determinação da sensibilidade e da curva padrão da RT-qPCR para a quantificação viral de ANV e CAstV e determinação da curva padrão do qPCR para a quantificação viral de ChPV

Para determinação da sensibilidade dos ensaios de ANV, CAstV e ChPV, o DNA plasmideal foi extraído e quantificado no *NanoDrop 2000 Spectrophotometer* (*NanoDrop Technologies, Thermo Scientific, Wilmington, USA*). Usando a ferramenta *on-line* da *Applied Biosystem DNA Copy Number and Dilution Calculator* (<http://www.thermofisher.com/br/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/dna-copy-number-calculator.html>) foi determinada a relação entre o número e a massa dos plasmídeos, para que uma diluição com concentração inicial de 10¹⁰ cópias fosse obtida. A partir desta diluição, foram realizadas 10 diluições seriadas do plasmídeo, na base 10. Dessa forma, a curva padrão foi realizada com o número de cópias de plasmídeos de 10 a 10.000.000.000. Foram determinados limites de detecção

para os três ensaios da última diluição onde a amplificação foi positiva. A eficiência da PCR também foi determinada sobre as diluições seriadas.

2.4 AVES, ALOJAMENTO E ALIMENTAÇÃO

Foram utilizados 160 pintinhos *SPF* com um dia de idade, divididos em quatro (04) grupos experimentais, três (03) grupos foram infectados com vírus (n=40) e um (01) grupo com 40 aves serviu como controle negativo. A infecção experimental teve a duração de 42 dias, tempo correspondente ao de uma criação comercial de frango para o abate. As aves foram alojadas na Sala Experimental de Patologia Aviária, em isoladores *ALESCO* (Alesco Indústria e Comércio Ltda. B. SP Brasil). As aves foram alimentadas com ração comercial de início, crescimento e finalização e água *ad libitum*.

2.4.1 Vírus

Foram utilizadas as cepas de astrovírus de galinha, parvovírus de galinha e vírus da nefrite aviária isoladas em ovos embrionados de galinha livre de patógenos específicos, no LABOR da FMVZ-USP, descritas no item 2.1 e utilizadas para a caracterização molecular.

2.4.2 Inoculo

O título viral foi determinado em 1,0 mL de inoculo, por meio da qPCR ou RT-qPCR, sendo que o título de cada um dos vírus administrado a cada ave foi de 207.8942,35 partículas virais (PV/0,1 mL) na infecção com astrovírus de galinha,de

1.095.645,59 PV/0,1 mL para o vírus da nefrite aviária, e para o parvovírus de galinha foi de 140.436,03 PV/0,1 mL. Todos os vírus estudados foram administrados por via oral.

2.5 DELINEAMENTO E INFECÇÃO EXPERIMENTAL

As aves foram inoculadas no primeiro dia de idade por via oral, como uso de uma cânula para depositar 100 µL do inoculo no Inglúvio. O grupo controle negativo recebeu o mesmo volume de PBS 0,1 M, pH 7,4, estéril. A partir do dia de recebimento das aves, cinco (05) animais foram sacrificados com intervalo de sete (07) dias (iniciando-se no dia zero (0) até os 42 dias de idade), para a colheita de amostras para a detecção e quantificação do vírus inoculado, e para o processamento histopatológico. Foram utilizadas trinta e cinco (35) aves de cada grupo experimental para a realização dos testes laboratoriais, cinco (05) aves em cada grupo experimental foram colocadas a mais para garantir o número exato de animais a serem analisados durante o experimento, caso houvesse mortalidade em qualquer um dos grupos experimentais. As aves foram sacrificadas em câmara de CO₂, com saturação de 70%, por 15 minutos, respeitando as Normas de Bioética e Bem-Estar Animal, aprovadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais da FMVZ-USP, protocolo N. 2569/2012.

2.6 AMOSTRAGEM, CONSERVAÇÃO E PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS

Foi realizada a necropsia das aves sacrificadas (n=5) e colhidos o duodeno, o jejuno e o íleo. Cada segmento do órgão foi colhido separadamente, com material cirúrgico estéril, sendo usado um material cirúrgico por amostra. Por semana, foram obtidos os segmentos de intestino e colocados em saco plástico estéril e armazenados

a -80°C até a sua utilização. No final do experimento, de cada grupo experimental se obteve 35 amostras.

2.6.1 Detecção e quantificação viral

Ácidos nucleicos de 30 mg de tecido de cada um dos segmentos de intestino de três aves foram extraídos com o reagente TRIzol, segundo as condições do fabricante. A presença ou ausência dos vírus foram investigados usando os ensaios de qPCR para *ChPV* e qRT-PCR para *CAstV* e *ANV* propostos no presente trabalho, usando as condições descritas no item 2.3.1 e 2.3.2. Cada amostra foi analisada em duplicata.

2.6.2 Histopatologia

Para a avaliação histopatológica um fragmento de cada segmento do intestino foi fixado em formalina tamponada 10%, pH 7,0, subsequentemente os fragmentos foram processados usando técnicas histológicas convencionais, embebidas em parafina, seccionados a 5,0 µm com um micrótomo, corados com hematoxilina e eosina e examinado com o microscópio de luz.

2.6.3 Avaliação das lesões microscópicas

A avaliação microscópica dos fragmentos de intestino delgado foi semiquantitativa segundo os parâmetros descritos no Quadro 4.

Na avaliação microscópica dos três segmentos de intestino delgado foram levadas em consideração a relação vilo:cripta, morfologia de cripta de Lieberkuhn;

intensidade de infiltrado de mononucleares e polimorfonucleares na lamina própria; presença e distribuição de folículos linfóides; número de linfócitos intra-epiteliais presentes em cada 100 enterócitos, e o número de células em mitoses presentes nas criptas em três campos de 400X.

A análise microscópica foi conduzida por dois observadores com experiência que desconheciam a identificação dos grupos. Foi utilizado microscópio de luz, nos aumentos de 40x, 100x, 200x e 400x. A documentação fotográfica das alterações microscópicas foi realizada em fotomicroscópio Ni-U com câmera digital DS3 acoplada, Nikon, Japão.

Quadro 4 - Distribuição dos parâmetros e escores semiquantitativos utilizados na análise histopatológica dos fragmentos de intestino delgado de pintinho de sete a 42 dias de vida

Parâmetros	Escore 0, DPN*	Escore 1, discreto	Escore 2, moderado	Escore 3, marcante
Morfologia de cripta quanto a necrose, hiperplasia, formato, dilatação, tortuosidade, bifurcação, presença de abscessos	Criptas uniformes, com área luminal estreita	>10% das criptas comprometidas	>25% das criptas comprometidas	>50% das criptas comprometidas
Intensidade de infiltrado de mononucleares ocupando a LP**	0-15% da LP	Até 50% da LP	Até 75% da LP	Até 100% da LP
Intensidade de infiltrado de polimorfonucleares ocupando a LP**	0-15% da LP	Até 50% da LP	Até 75% da LP	Até 100% da LP

Fonte: (NÚÑEZ, L. F. N., 2015)

Legenda: *DPN= dentro do parâmetro de normalidade; **LP= lâmina própria

2.7 ANÁLISE DOS DADOS

Os dados de peso, número de células em mitose e o número de linfócitos intra-epiteliais, foram avaliados usando o teste de *Kruskal-Wallis: Comparações Múltiplas*. As avaliações semiquantitativas das variáveis: presença de células polimorfonucleares e mononucleares na lamina própria e alterações da morfologia de cripta foram avaliadas usando o teste de Chi^2 .

3 RESULTADOS

3.1 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

A amplificação do gene *VP1/VP2* do *ChPV* gerou um fragmento de 373 pb, a amplificação do gene *ORF 1b* e *ORF 2* do *CAstV* gerou um fragmento de 510 pb e a amplificação do gene *ORF 1b* do *ANV* gerou um fragmento de 472 pb.

A análise filogenética da sequência de nucleotídeos da cepa de *ChPV* estudada mostrou que o vírus está tem 95,8 % de similaridade de nucleotídeos (NT) e 100% de similaridade de amino ácidos (AA) com o isolado da Hungria ABU-1P, 89% de similaridade de NT e 93,5% de AA com as sequências dos isolados da Korea e 78,3% de similaridade de NT e 85,4 de similaridad de AA com a cepa de parvovírus dos perus (*TuPV*). Estes resultados se encontram na Tabela 1.

Tabela 1 - Relação molecular entre o isolado Brasileiro e os isolados da Hungria e Korea de *ChPV* baseados na identidade de nucleotídeos (embaixo da diagonal) ou na identidade de aminoácidos (acima da diagonal)

N	Sequência	Identidade de Amino ácidos (%)						
		1	2	3	4	5	6	7
1	BRASIL_USP_66	-	100	93,5	93,5	93,5	85,4	47,6
2	HUNGRIA ABU-1P	95,4	-	93,5	93,5	93,5	85,4	47,6
3	KOREA_AJB28746.1	89,8	91,4	-	100	100	87,9	46
4	KOREA_AJB28750.1	89,8	91,4	100	-	100	87,9	46
5	KOREA_AJB28742.1	89,8	91,4	100	100	-	87,9	46
6	TuPV_ADD22711.1	78,3	78	77,8	77,8	77,8	-	42,8
7	PPV_AGW95845.1	53	54,5	53,5	53,5	53,5	53,8	-
		Identidade de Nucleotídeos (%)						

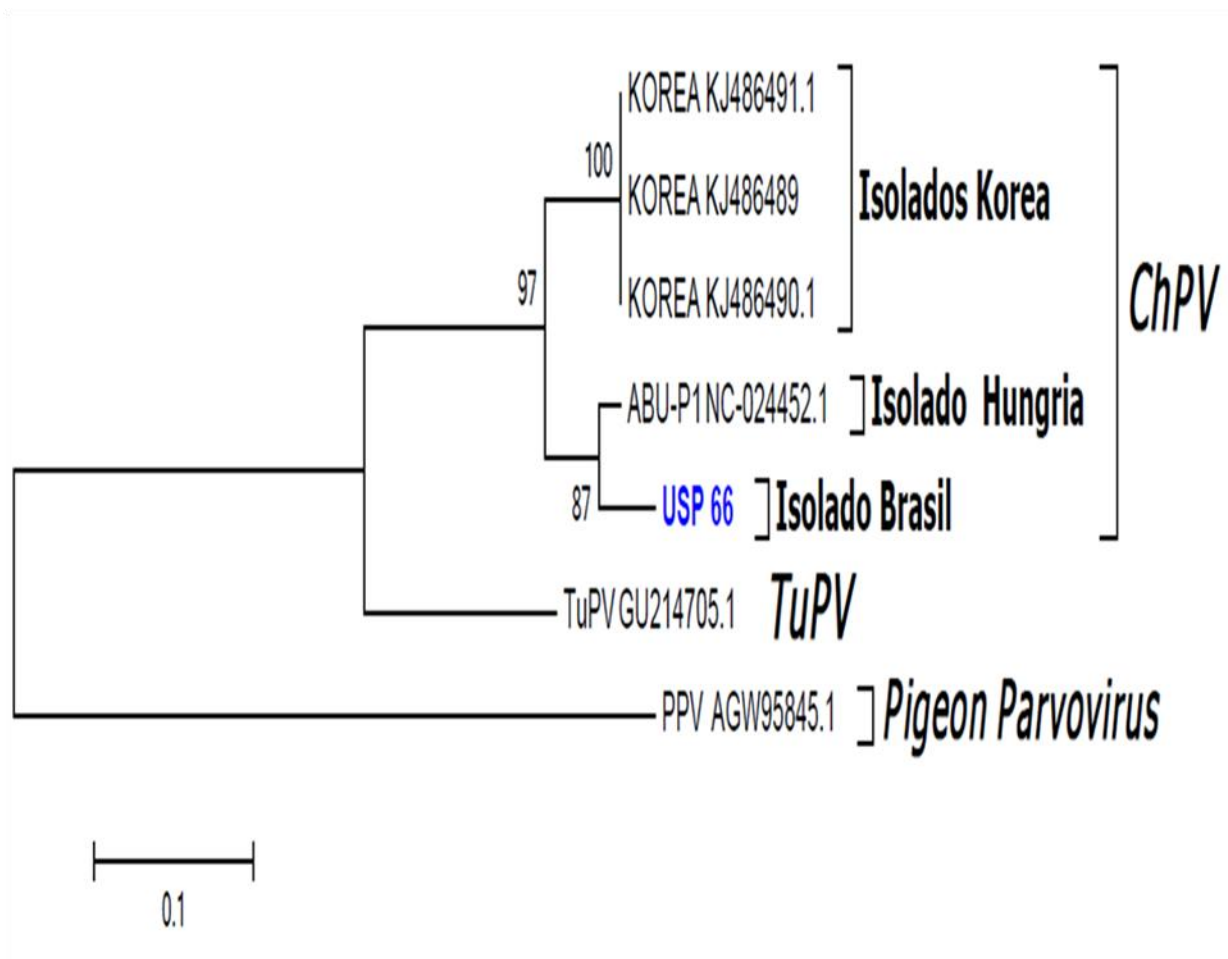
Fonte: (NÚÑEZ, L. F. N., 2015)

LEGENDA: *TuPV* = Parvovírus dos Perus; *PPV* = *Pigeon Parvovirus*

A análise filogenética das sequências de *ChPV* separou todos os isolados de *ChPV* (valor de *bootstrap* de 97,0% e 0,1132 substituições por sítio) do isolado de

TuPV. O grupo dos isolados de *ChPV* mostrou dois grupos: o Grupo dos isolados da Korea (valor de *bootstrap* de 100,0% e 0,0475 substituições por sítio) e o Grupo que inclui o isolado da Hungria ABU-1P e o isolado Brasileiro (valor de *bootstrap* de 87,0% e 0,0338 substituições por sítio). A figura 1 mostra estes resultados.

Figura 1 - Relações filogenéticas entre a cepa de *ChPV* estudada no presente trabalho, e as sequências dos isolados da Hungria e da Korea de *ChPV* e o isolado de *TuPV*, baseados nas sequências de nucleotídeos do gene VP1/VP2



Fonte: (NÚÑEZ, L. F. N., 2015)

LEGENDA: As sequências foram alinhadas usando o método CLUSTAL W no MEGA 5. Os números ao longo dos ramos mostram o valor do *Bootstrap* para cada 1000 replicados. A barra da escala representa o número de substituições por sítio. Em azul a sequência da cepa de *ChPV* estudada no presente trabalho.

Nota: A sequência de *Pigeon Parvovirus* foi usada como *outgroup*.

A análise das sequências da cepa de *CAstV* (infecção experimental) mostrou que o vírus tem de 88,3 a 100% de similaridade de NT e 94,7 a 100% de similaridade de AA com outras sequências do Brasil. Ao ser comparada com outras sequências classificadas no Grupo I do *CAstV* mostrou 88,3 a 91,1% de similaridade de NT e 95,3 a 97,3% de similaridade de AA com as sequências dos USA, de 88,3 a 90,7% de similaridade de NT e 94,7 a 97,3% de similaridade de AA com a sequência da Índia, de 86,0 a 91,3% de similaridade de NT e 92,7 a 100% de similaridade de AA com as sequências da Inglaterra (UK). Ao ser comparada com as sequências classificadas no Grupo II do *CAstV* mostrou uma porcentagem de similaridade de 76,6 a 80,1% de NT e 82,7 a 84,7% de AA. Estes resultados se encontram na Tabela 2.

Tabela 2 - Relação molecular entre os isolados Brasileiros com os de outras seqüências de CAstV baseados na identidade de nucleotídeos (embaixo da diagonal) ou na identidade de aminoácidos (acima da diagonal)

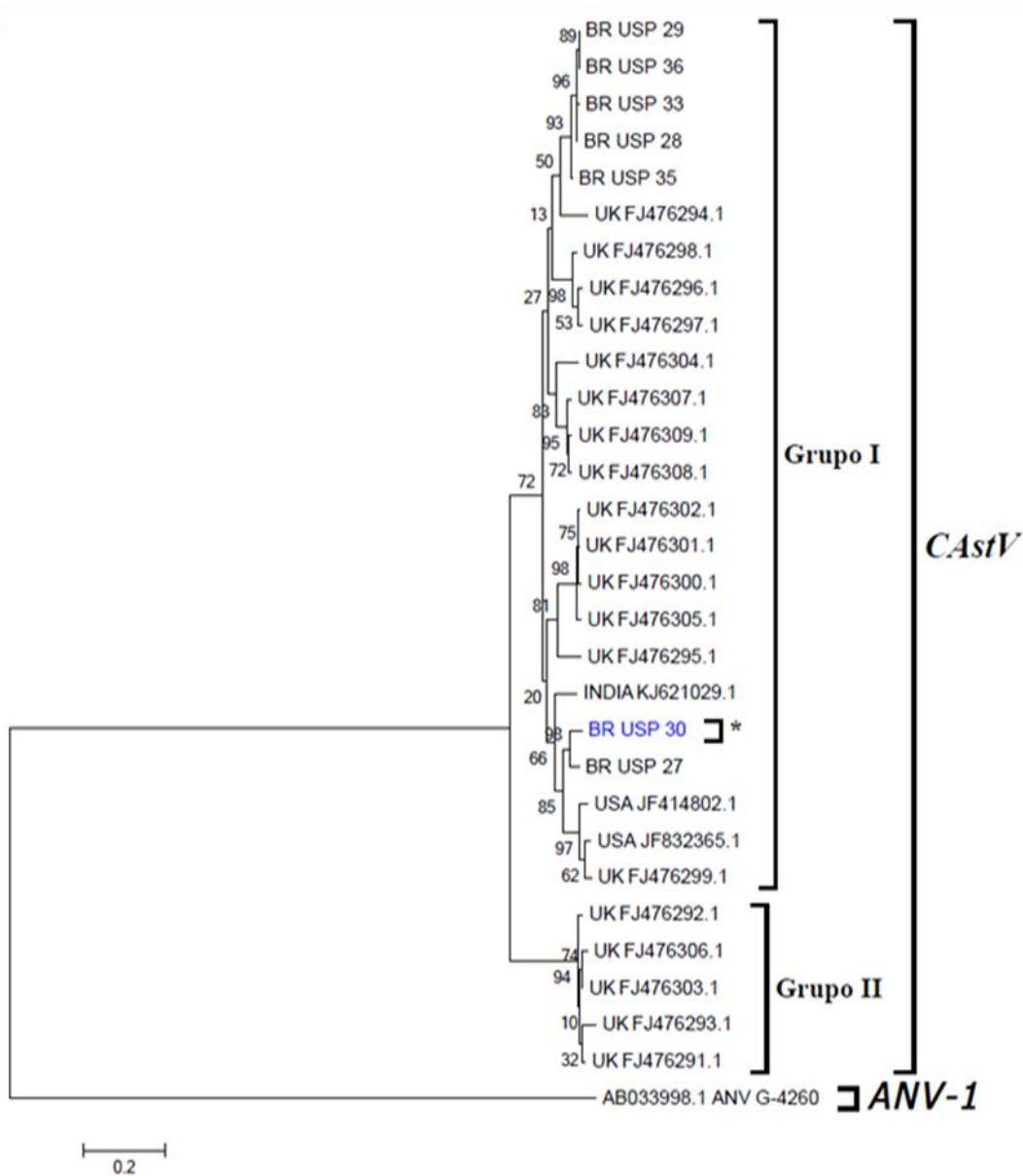
N.	Seqüências	CAstV																	
		GRUPO I									GRUPO II								
		Identidade de Aminoácidos (%)																	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18		
1	BR_USP_30	-	98,6	94,7	95,3	94,7	94,7	97,3	95,3	96,6	95,3	94,7	92,7	94,7	84,1	82,7	84,1	84,1	84,1
2	BR_USP_27	95,1	-	95,3	96,0	95,3	97,3	96,0	97,3	96,0	97,3	96,0	92,0	94,7	84,1	82,7	84,1	84,1	84,1
3	BR_USP_33	88,7	87,8	-	99,3	100	96,6	96,0	95,3	96,6	98,6	96,0	93,3	98,0	84,7	84,7	84,7	84,7	84,7
4	BR_USP_35	88,9	88,3	97,5	-	99,3	97,3	96,6	96,0	97,3	99,3	96,6	94,0	98,6	84,1	84,1	84,1	84,1	84,1
5	BR_USP_36	89,1	87,8	99,1	97,5	-	96,6	96,0	95,3	96,6	98,6	96,0	93,3	98,0	84,7	84,7	84,7	84,7	84,7
6	INDIA_KJ621029.1	90,7	89,8	88,3	88,7	88,7	-	96,6	96,0	97,3	96,6	95,3	92,7	96,0	84,1	82,7	84,1	84,1	84,1
7	USA_JF414802.1	90,2	90,7	88,7	88,7	88,3	88,7	-	97,3	98,6	96,6	95,3	94,0	96,0	84,7	83,4	84,7	84,7	84,7
8	USA_JF632365.1	90,2	91,1	88,0	87,6	87,6	88,3	95,8	-	98,6	96,0	94,7	92,7	94,7	84,7	83,4	84,7	84,7	84,7
9	UK_FJ476299.1	90,0	91,3	88,0	87,6	87,6	87,4	95,8	96,9	-	97,3	96,0	94,0	96,0	84,7	83,4	84,7	84,7	84,7
10	UK_FJ476298.1	88,3	87,6	90,0	91,1	90,0	88,9	88,5	87,6	87,4	-	96,0	94,0	98,0	84,1	84,1	84,1	84,1	84,1
11	UK_FJ476294.1	86,5	87,6	90,2	91,3	89,8	88,3	85,4	85,6	84,9	88,7	-	94,7	95,3	82,1	82,1	82,1	82,1	82,1
12	UK_FJ476295.1	87,1	86,3	87,8	88,5	87,8	86,9	86,5	85,6	87,8	88,5	-	93,3	82,1	82,1	82,1	82,1	82,1	82,1
13	UK_FJ476309.1	88,5	88,9	88,0	89,4	88,0	89,1	88,9	86,5	86,0	90,2	87,8	88,0	-	83,4	83,4	83,4	83,4	83,4
14	UK_FJ476292.1	77,4	76,1	79,2	79,0	79,2	77,9	78,5	77,9	77,2	77,9	76,6	76,6	77,0	-	98,6	100	100	100
15	UK_FJ476306.1	78,3	76,6	79,2	78,8	79,2	78,1	78,8	78,5	77,4	77,9	77,7	76,8	77,2	96,9	-	98,6	98,6	98,6
16	UK_FJ476303.1	77,9	76,6	79,2	78,8	79,2	78,1	78,8	78,5	77,4	77,7	77,2	76,1	77,4	98,0	98,8	-	100	100
17	UK_FJ476293.1	77,9	76,6	78,1	78,1	78,1	78,1	78,8	78,1	77,9	77,4	76,3	76,8	76,6	95,8	94,9	95,5	-	100
18	UK_FJ476291.1	78,1	76,8	80,1	79,2	79,6	77,7	79,0	78,3	77,7	77,7	77,2	76,8	77,4	97,3	96,9	98,0	96,2	-

Identidade de Nucleotídeos

Fonte: (NUÑEZ, L. F. N., 2015)

A análise filogenética determinou dois grupos bem definidos: o Grupo I (valor de *bootstrap* de 72,0% e 0,0282 substituições por sítio) e o Grupo II (valor de *bootstrap* de 94,0% e 0,0293 substituições por sítio). A sequência estudada foi agrupada no Grupo I, junto com outras sequências do Brasil em um *cluster* (valor de *bootstrap* de 98,0% e 0,0172 substituições por sítio), onde se encontram também as sequências da Índia, do UK e dos USA e colocou as outras sequências do Brasil agrupadas em um mesmo *cluster* (valor de *bootstrap* de 66,0% e 0,0198 substituições por sítio). A Figura 2 mostra estes resultados.

Figura 2 - Relações filogenéticas entre a cepa de *CAstV* estudada no presente trabalho e as outras sequências do Brasil, dos Estados Unidos (USA), da Índia e da Inglaterra (UK), baseadas nas sequências de nucleotídeos do gene ORF 1b



Fonte: (NÚÑEZ, L. F. N., 2015)

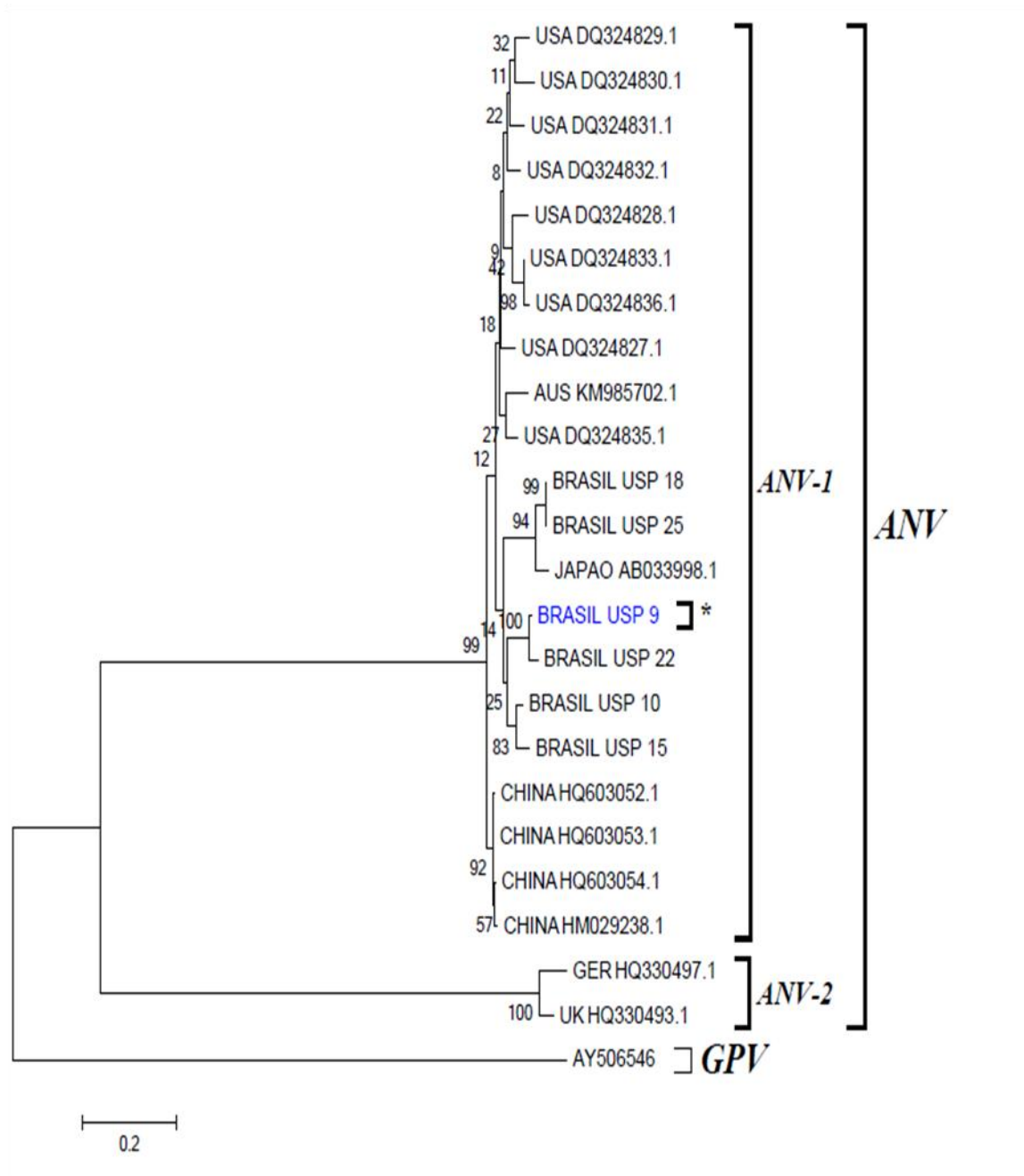
LEGENDA: As sequências foram alinhadas usando o método CLUSTAL W no MEGA 5. Os números ao longo dos ramos mostram o valor do *Bootstrap* para cada 1000 replicados. A barra da escala representa o número de substituições por sítio. Em azul e assinalada por * corresponde à cepa de *CAstV* estudada no presente trabalho.

Nota: A sequência do ANV-1 foi usada como *outgroup*.

A análise molecular da sequência da cepa de ANV usada na infecção experimental mostrou que o vírus tem de 94,9 a 100% de similaridade de AA e de 87,7 a 100% de similaridade de NT com as outras sequências do Brasil. Ao ser comparada com as sequências de outros países genotipadas como ANV-1 mostrou 87,7 a 92,6% de similaridade de NT e 95,5 a 96,8% de similaridade de AA com a sequência da Austrália (AUS), de 86,8 a 94,9% de similaridade de NT e 92,9 a 96,8% de similaridade de AA com a sequência do Japão, de 86,4 a 92,3% de similaridade de NT e 92,3 a 98,7% de similaridade de AA com as sequências dos Estados Unidos (USA) e 87,5 a 92,1% de similaridade de NT e 94,2 a 96,8% de similaridade de AA com as sequências da China. No entanto, quando comparada com as sequências genotipadas como ANV-2 mostrou de 40,2 a 41,4% de similaridade de NT e 10,9 a 11,5% de similaridade de AA com a sequência proveniente da Alemanha (GER) e 40,8 a 41,6% de similaridade de NT e 10,9 a 12,1% de similaridade de AA com a sequência da Inglaterra. Estes resultados se encontram na Tabela 3.

A análise filogenética determinou dois grupos bem definidos, um grupo (valor de *bootstrap* de 99,0% e 0,8181 substituições por sítio) que envolve as sequências genotipadas como ANV-1 e um segundo grupo (valor de *bootstrap* de 100% e 0,9301 substituições por sítio) que agrupou as sequências genotipadas como ANV-2. A sequência da cepa de ANV investigada no presente trabalho foi agrupada no grupo ANV-1, dentro de este grupo a sequência foi agrupada com outra sequência do Brasil (valor de *bootstrap* de 100% e 0,0059 substituições por sítio), mostrando também que as sequências do Brasil estão agrupadas com a sequência do Japão em um mesmo *cluster* (valor de *bootstrap* de 25% e 0,0059 substituições por sítio). A Figura 3 mostra estes resultados.

Figura 3 - Relações filogenéticas da cepa de ANV estudada no presente trabalho com as outras sequências do Brasil, dos Estados Unidos (USA), da China, da Alemanha (GER), da Inglaterra (UK), da Austrália (AUS) e do Japão, baseados nas sequências de nucleotídeos do gene ORF 1b e ORF 2



Fonte: (NÚÑEZ, L. F. N., 2015)

LEGENDA: As sequências foram alinhadas usando o método CLUSTAL W no MEGA 5. Os números ao longo dos ramos mostram o valor do *Bootstrap* para cada 1000 replicados. A barra da escala representa o número de substituições por sítio. Em azul e assinalada por * corresponde à cepa de ANV estudada no presente trabalho.

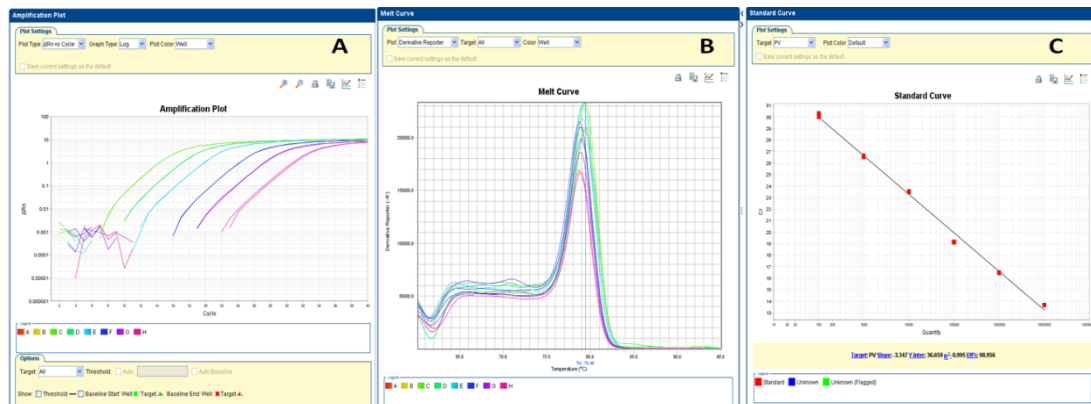
NOTA: A sequência do Parvovírus dos Gansos (GPV) foi usada como *outgroup*.

Os resultados classificaram a cepa do *CAstV* estudada e as outras sequências do Brasil como parte do grupo I dos *CAstV*, genotipou a cepa do *ANV* usada na infecção experimental e as outras cepas do Brasil como *ANV-1*, e mostrou que a cepa do *ChPV* estudada no presente trabalho faz parte do grupo do isolado da Hungria ABU-1P.

3.2 PADRONIZAÇÃO DE UMA REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE EM TEMPO REAL (qPCR) PARA A DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO *ChPV*

A reação de qPCR orientada à detecção e quantificação de um fragmento do gene *NS* do *ChPV* conseguiu detectar e quantificar partículas virais de 10 até 10^9 cópias do plasmídeo (cada cópia equivale a uma partícula viral), mostrando uma curva com uma eficiência de 98% com um *slope* de -3,347, e um valor de R^2 de 0,995, a curva de *melting* se apresentou limpa sem presença de curvas adicionais, mostrando a geração de um produto específico de amplificação a uma temperatura de 78,45°C, sem a presença de produtos inespecíficos, como os dímeros. Estes resultados se encontram na Figura 4.

Figura 4 - Padronização da qPCR para *ChPV*



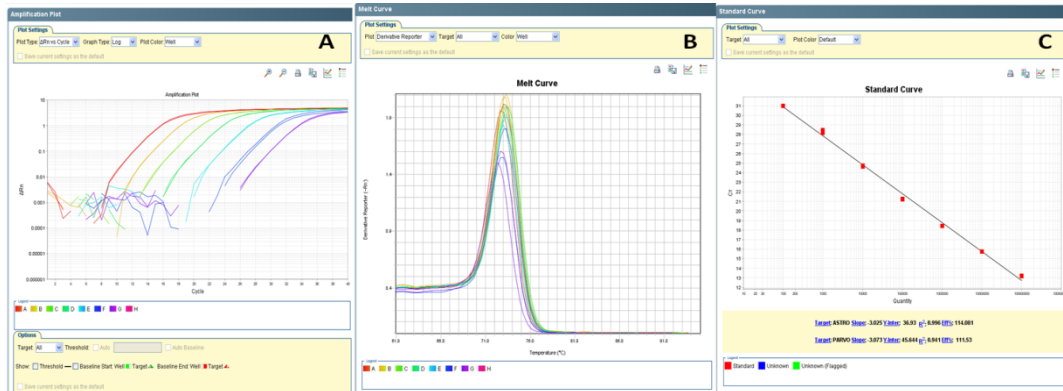
Fonte: (NÚÑEZ, L. F. N., 2015)

LEGENDA: A = Gráfico de amplificação; B = Curva de *melting*; C = Curva de eficiência, gerados na padronização e desenvolvimento da reação de qPCR para a detecção e quantificação do *ChPV*.

3.3 PADRONIZAÇÃO DE UMA REAÇÃO DE TRANSCRIÇÃO REVERSA DA REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE EM TEMPO REAL (RT-qPCR) PARA A DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO *CAStV*

A RT-qPCR para a detecção e quantificação de um fragmento do gene ORF 1b do *CAStV* amplificou um fragmento de 112 pb, e conseguiu detectar e quantificar partículas virais de 10 até 10^{10} cópias do plasmídeo (cada cópia equivale a uma partícula viral), mostrando uma curva com uma eficiência de 114% com um *slope* de -3,025, e um valor de R^2 de 0,996. A curva de *melting* se apresentou limpa, sem a presença de curvas adicionais, mostrando a geração de um produto específico de amplificação a uma temperatura de 73°C, sem a presença de produtos não específicos como os dímeros. A Figura 5 mostra estes resultados.

Figura 5 - Padronização da RT-qPCR para *CAstV*



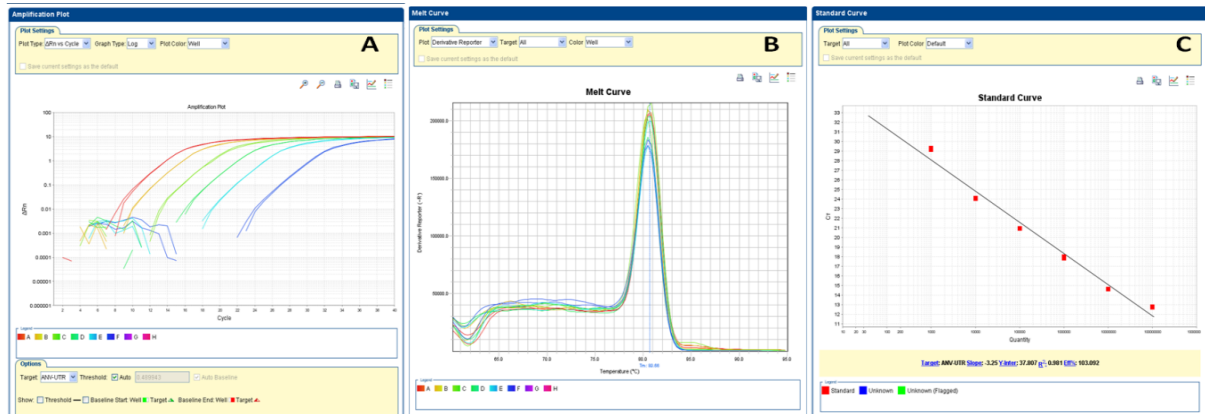
Fonte: (NÚÑEZ, L. F. N., 2015)

LEGENDA: A = Gráfico de amplificação; B = Curva de *melting*; C = Curva de eficiência, gerados na padronização e desenvolvimento da reação de qPCR para a detecção e quantificação do *CAstV*.

3.4 PADRONIZAÇÃO DE UMA REAÇÃO DE TRANSCRIÇÃO REVERSA DA REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE EM TEMPO REAL (RT-qPCR) PARA A DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO ANV

A RT-qPCR para a detecção e quantificação de um fragmento do gene *utr* do ANV amplificou um fragmento de 189 pb, e conseguiu detectar e quantificar partículas virais de 10 até 10^{10} cópias do plasmídeo (cada cópia equivale a uma partícula viral), mostrando uma curva com uma eficiência de 103,92% com um *slope* de -3,25 e $R^2=0,981$, a curva de *melting* se apresentou limpa, sem a presença de curvas adicionais, mostrando a geração de um produto específico de amplificação a uma temperatura de 80°C, sem a presença de produtos inespecíficos como os dímeros. Estes resultados se encontram na Figura 6.

Figura 6 - Padronização da RT-qPCR para ANV



Fonte: (NÚÑEZ, L. F. N., 2015)

LEGENDA: A = Gráfico de amplificação; B = Curva de *melting*; C = Curva de eficiência, gerados na padronização e desenvolvimento da reação de qPCR para a detecção e quantificação do ANV.

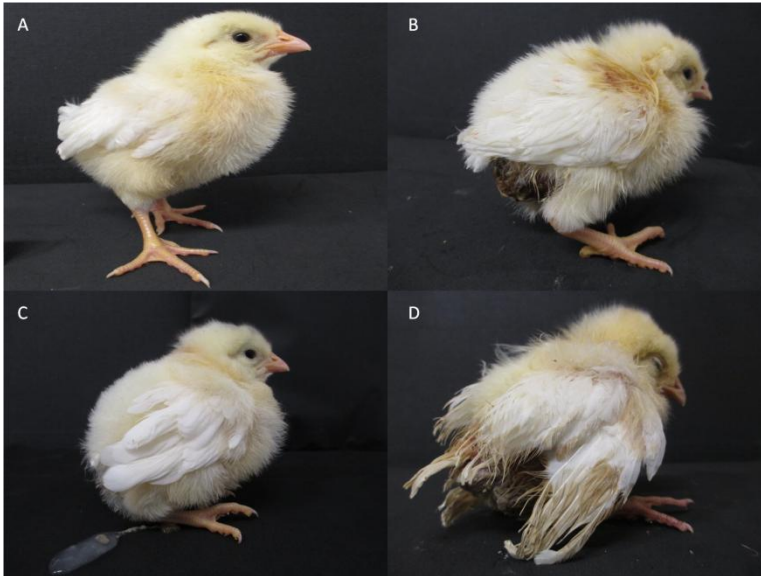
3.5 INFEÇÃO EXPERIMENTAL

3.5.1 Sinais clínicos

Após 12 horas da inoculação foram observados os seguintes sinais clínicos: depressão, letargia, sonolência e eriçamento das penas, e foi evidenciada a presença de diarreia nos três grupos experimentais. Após 48 horas da infecção era evidente a presença de animais com empastamento cloacal, penas da região da cloaca molhadas e sujas e penas mais eriçadas. A sonolência e letargia foram aumentando, mostrando aves com uma movimentação menor e com mais apatia, ocorreu aumento de diarreia. Os sinais clínicos de doença entérica, principalmente, de diarréia, se mantiveram ao longo do experimento. As Figuras 7-B e 7C mostram estes resultados. O grupo infectado com o *ChPV* mostrou as penas das asas com um aspecto diferente, se encontrando dobradas na direção externa.

O grupo controle negativo não apresentava nenhum dos sinais acima descritos, e os animais mostravam mais movimentação e aspecto saudável. A figura 7A mostra estes resultados.

Figura 7 – Sinais clínicos dos grupos estudados



Fonte: (NÚÑEZ, L. F. N., 2015)

LEGENDA: A= Pintinho de sete (07) dias de idade do grupo controle negativo, sem sinais de doença entérica; B= pintinho do grupo infectado com *ChPV*; C= Pintinho do grupo infectado com *CAstV*; D= Pintinho do grupo infectado com *ANV*, os três grupos apresentavam sinais de doença entérica como apatia, sonolência, eriçamento de penas, empastamento cloacal e diarreia.

Dez dias após a infecção começou a ser evidente a presença de animais com diferentes tamanhos, existindo animais menores e nanicos. A Figura 8 apresenta estes resultados.

Figura 8 – Diferença de tamanho dos animais



Fonte: (NÚÑEZ, L. F. N., 2015)

LEGENDA: Ave à esquerda, pintinho de 14 dias de idade mostrando um tamanho aparentemente normal, à direita animal mostrado diminuição de tamanho, mostrando nanismo.

3.5.2 Avaliação macroscópica

As aves do grupo controle negativo não apresentaram nenhuma alteração macroscópica. O aspecto macroscópico do sistema digestório, em especial das alças intestinais, está apresentado nas Figuras 9-A, 9-B e 9C.

A avaliação macroscópica das aves inoculadas com *ChPV*, *CAstV* e *ANV* revelou em todas as aves alterações de comportamento e gastrointestinais caracterizadas por aves com letargia, sonolência, penas eriçadas, presença de empastamento cloacal, e penas sujas por fezes líquidas na região da cloaca. O exame *in situ* da cavidade celomática mostrou alças intestinais distendidas e preenchidas por conteúdo líquido e por gases. Estes resultados se encontram nas Figuras 9-D, 9-G e 9-J. As alças intestinais exibiam segmentações ao longo do intestino delgado, em que havia trechos dilatados e outros estreitos em que o conteúdo era líquido, com gás e alimento não digerido. As Figuras 9-E, 9-H e 9-K mostram estes resultados. As aves apresentavam a

persistência do saco da gema. O divertículo, proventriculo e ventrículo, bem como os demais órgãos não apresentaram alterações macroscópicas.

As aves inoculadas com *ChPV* mostraram, além das alterações descritas em comum aos grupos estudados, vólvulo intestinal em que há rotação do segmento de alça duodenal no eixo mesentérico, se assemelhando a um “saca rolhas”. O mesentério apresentou opacificação neste segmento e havia atrofia do pâncreas. As Figuras 9-E e 9-F mostram estes resultados.

Figura 9 – Avaliação macroscópica dos grupos em estudo



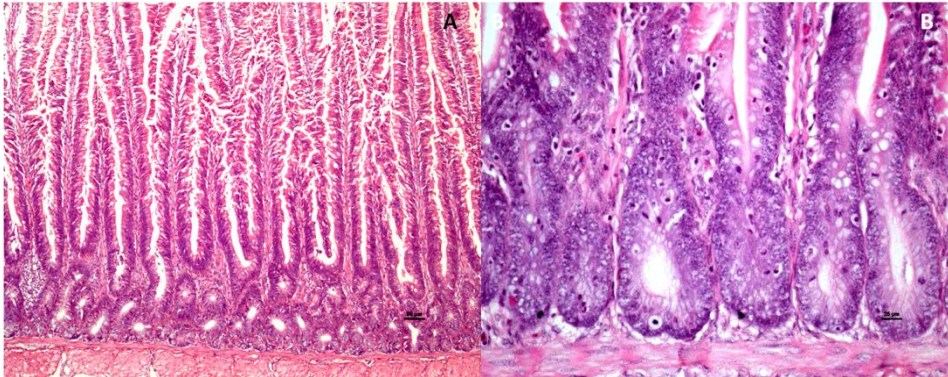
Fonte: (NÚÑEZ, L. F. N., 2015)

LEGENDA: Figura 9 - A, B, C: Aves do grupo controle negativo; D, E, F: Aves do grupo infectado com *ChPV*; G, H, I: Aves do grupo infectado com *CAstV*; J, K, L: Aves do grupo infectado com *ANV*; A, D, G, J: Posição dos órgãos na cavidade celômica dos grupos em estudo; B, E, H, K distribuição e diâmetro das alças intestinais, três últimas mostrando presença de líquido e gás; C, F, I, L: Alça duodenal e pâncreas; F: mostrando vólvulo parcial em eixo mesentérico sem isquemia do segmento e conferindo aspecto de um saca-rolha na alça duodenal, presente unicamente neste grupo

3.5.3 Avaliação microscópica

As aves do grupo controle negativo mostraram os segmentos de duodeno, jejuno e íleo dentro do padrão de histologia normal. A Figura 10 mostra estes resultados.

Figura 10 - Fotomicroscopia do intestino delgado de pintinhos, aos 7 dias de vida, do grupo controle negativo

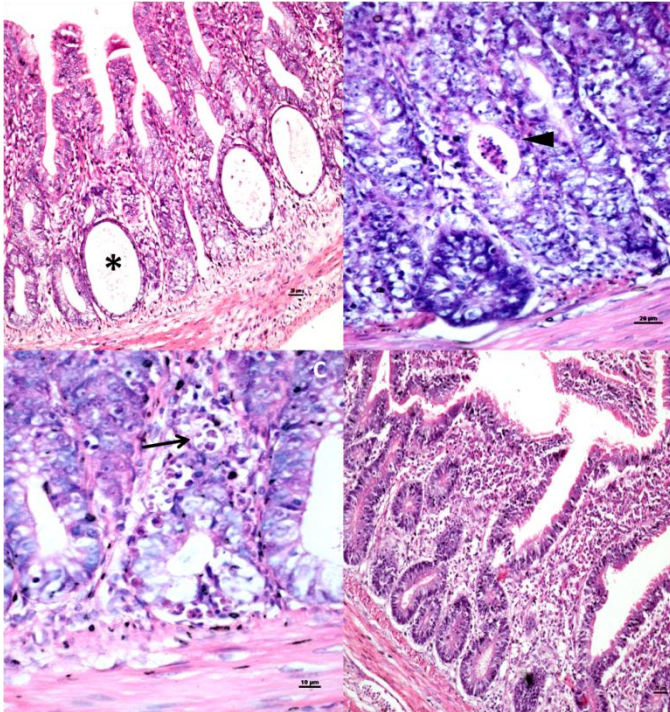


Fonte: (NÚÑEZ, L. F. N., 2015)

LEGENDA: A: Aspecto da distribuição e formato das vilosidades, bem como das criptas; B: Aspecto microscópico das criptas de Lieberkuhn com lúmen estreito e uniformidade de forma e tamanho. Criptas dentro do padrão de normalidade. Hematoxilina- eosina

As aves do grupo infectado com *ChPV* mostraram relação vilo:cripta preservada, hiperplasia de cripta de leve a moderada ($p < 0,05$) com presença de criptas bifurcadas, dilatadas, alongadas e tortuosas nos diferentes período de avaliação. Do sétimo ao 42º dia após a inoculação, foram observados abscessos de cripta no duodeno, jejuno e íleo. Estes resultados se encontram nas Figuras 11-A; 11-B. Entre o sétimo e 28º dia da infecção, foi observado necrose de cripta em todos os segmentos do intestino delgado ($p < 0,05$), associado a estes resultados ocorreu um aumento no número de mitoses no segmento duodenal e aumento do número de linfócitos intraepiteliais do sétimo ao 42º dia ($p < 0,05$). A figura 11-C mostra estes resultados. A densidade de linfócitos e plasmócitos na lâmina própria duodenal foi significativa ($p = 0,038$) do sétimo ao 28º dia da inoculação no duodeno, no jejuno do 14º ao 42º dia ($p = 0,038$), e no íleo do 35º ao 42º dia da infecção ($p = 0,038$). Estes resultados se encontram na Figura 11-D. Nas tabelas 6, 7 e 8 se encontram a distribuição dos parâmetros histopatológicos do sistema digestório dos grupos estudados. No mesentério do segmento duodenal e peripancreático foi diagnosticado mesenterite linfoplasmocítica associada à pancreatite.

Figura 11 - Fotomicroscopia dos fragmentos de intestino das aves infectadas com *ChPV*

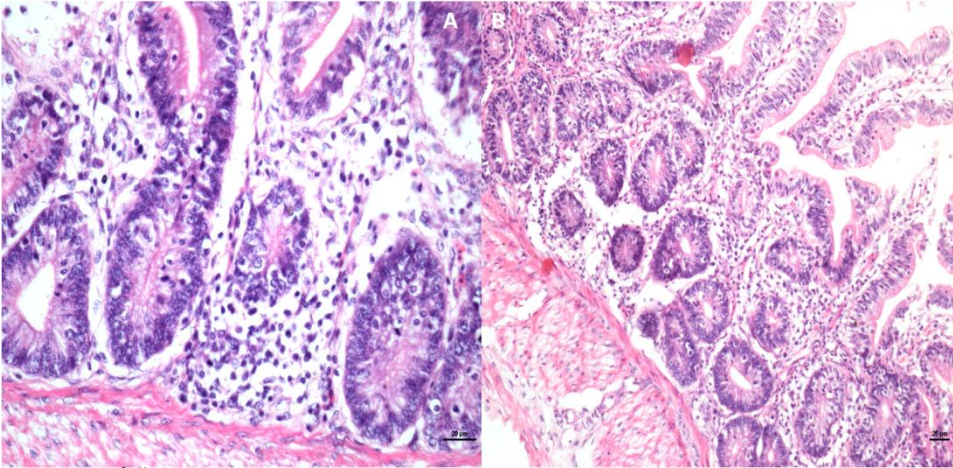


Fonte: (NÚÑEZ, L. F. N., 2015)

LEGENDA: A = Lesões microscópicas no intestino de um ave de sete dias do grupo infectado com *ChPV*, presença de abscessos de cripta de Lieberkuhn; B = Ave de 7 dias, com presença de hiperplasia e abscesso de cripta Lieberkuhn; C = Ave aos 14 dias, lesões microscópicas das criptas de Lieberkuhn mostrando hiperplasia de cripta e presença de células em necrose; D = Ave aos 21 dias, mostrando enterite discreta caracterizada pelo aumento de linfócitos e plasmócitos; * = abscesso de cripta de Lieberkuhn; ◄ = abscesso de cripta com restos celulares e células em degeneração. Seta, células em necrose, na cripta. Hematoxilina-Eosina.

As aves do grupo infectado com *CAstV*, mostraram uma relação vilo:cripta preservada, discreta hiperplasia de criptas no duodeno, jejuno e íleo ($p < 0,05$) em todos os períodos de análise. Em pelo menos um dos segmentos do intestino delgado e um período da análise, houve aumento do número de células da cripta em mitoses ($p < 0,05$) e aumento do número de linfócitos intra-epiteliais ($p < 0,05$). Foi diagnosticado enterite aguda heterofílica em jejuno no dia 7 após inoculação ($p = 0,010$) ao dia 21 ($p = 0,002$) este resultado se encontra na Figura 12. No duodeno e íleo essas lesões não foram observadas.

Figura 12 - Fotomicroscopia de segmentos de intestino de um pintinho de 7 dias de idade, infectado com CAstV

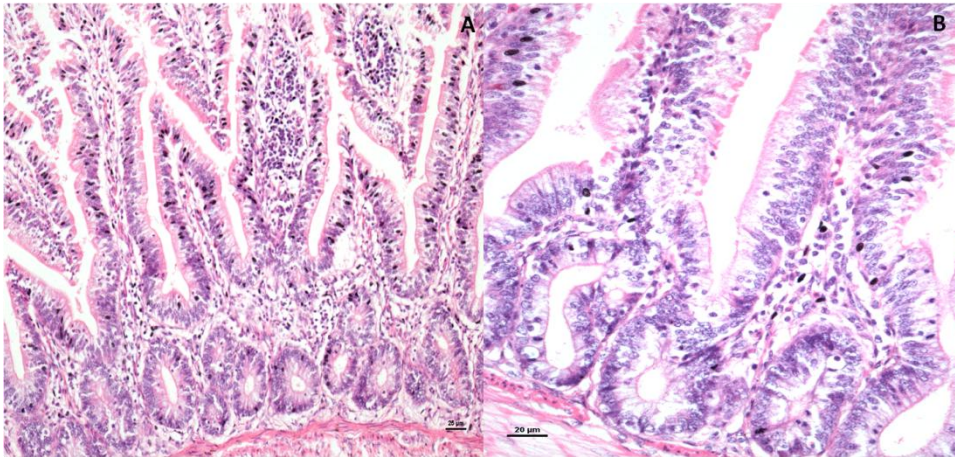


Fonte: (NÚÑEZ, L. F. N., 2015)

LEGENDA: A e B: Lesões microscópicas do intestino caracterizadas por hiperplasia discreta de criptas de Lieberkuhn associada a enterite linfoplasmocítica discreta. Hematoxilina-Eosina.

As aves do grupo infectado com ANV, mostraram uma relação vilo:cripta preservada, discreta hiperplasia de cripta nos três segmentos do intestino delgado ($p < 0,05$) e em todos os períodos de coleta. Foi observado um aumento no número de células da cripta em mitose nos três segmentos do intestino, e aumento do número de linfócitos intraepiteliais. Foi observado uma discreta enterite linfoplasmocítica no jejuno no 21º dia ($p = 0,038$) e no íleo nos 35º e 42º dia após a inoculação, mas sem diferença estatística significativa ($p > 0,05$). A figura 13 mostra estes resultados. Ocorreu a presença de mesenterite linfoplasmocítica nos segmentos do duodeno, jejuno e íleo, sem ser significativa. As tabelas 6, 7 e 8 apresentam a distribuição dos parâmetros histopatológicos analisados em todos os grupos experimentais, segundo os períodos de análise.

Figura 13 - Fotomicroscopia de segmentos de intestino delgado em pintinhos, de 21 dias de idade infectados com ANV



Fonte: (NÚÑEZ, L. F. N., 2015)

LEGENDA: A = Lesões microscópicas do intestino mostrando hiperplasia discreta de criptas de Lieberkuhn e presença de discreta enterite linfoplasmocítica; B = Discreta hiperplasia de criptas. Hematoxilina – eosina

Tabela 6 - Distribuição dos parâmetros histopatológicos analisados nos fragmentos de duodeno, nas aves dos grupos experimentais estudados e nos períodos de análise

Dias da Colheita	Grupo:	Duodeno										Valor P	Valor P			
		Mesenterite					Morfologia de Cripta							Lâmina Própria		VILO
		Hiperplasia de Cripta	Abscessos	Necrose	Número de Células em Mitose	Valor P	Folículos Linfóides	Infiltrado de Heterófilos	Infiltrado de Linfócitos	Linfócitos Intra-epitelial						
7 dias	C- ChPV CASTV ANV	N (+/2/5); ++(3/5)* +(5/5)* (+/2/4); ++(2/4))*	P(3/5) P(5/5)	P(5/5) P(5/5)	6,5 ±1,19 12,0 ±6,09 10,9 ±2,68 17,1 ±2,11	* 0,0490							4,7 ±0,88 11,5 ±1,86 15,3 ±3,73 15,3 ±4,77	* 0,0057 * 0,0115		
14 dias	C- ChPV CASTV ANV	N (+/2/5); ++(3/5)* +(4/5)* (+/1/5); ++(4/5))*	P(3/5) P(5/5)	P(5/5) P(5/5)	5,1 ±0,92 6,4 ±2,03 8,9 ±2,27 11,5 ±3,35	*0,4067 *0,0476 *0,0021							2,1 ±0,37 11,6 ±3,72 15,5 ±2,94 12,1 ±1,75	*0,0300 *0,0002 *0,0280		
21 dias	C- ChPV CASTV ANV	(+/2/5); ++(3/5)* (+/4/5); ++(1/5)* (+/4/5); ++(1/5))*	P(4/5) P(1/5)	P(2/5) P(2/5)	3,4 ±0,43 11,1 ±3,6 6,7 ±1,63 9,3 ±1,94	*0,0006 0,0755 *0,0064							6,8 ±1,30 16,7 ±1,15 15,3 ±2,89 13,6 ±1,59	* 0,0021 * 0,0123 * 0,0453		
28 dias	C- ChPV CASTV ANV	N(4/5); +(1/5)DNS (+/3/5); ++(2/5))* +(5/5)* +(5/5)*	P(5/5) P(3/5)	P(5/5) P(3/5)	4,8 ±1,12 15,9 ±4,64 6,2 ±1,56 7,0 ±0,97	*0,0002 0,2387 0,0609							6,1 ±1,84 15,6 ±1,10 13,4 ±1,17 14,4 ±2,73	*0,0054 *0,0283 *0,0035		
35 dias	C- ChPV CASTV ANV	(+/5/5)* (+/2/4); ++(2/4))* (+/2/4); ++(2/4))*	P(5/5) P(5/5)	P(5/5) P(5/5)	4,0 ±1,22 10,5 ±2,06 11,1 ±2,38 9,8 ±0,84	*0,0089 *0,0024 0,0592							6,1 ±2,23 13,0 ±2,08 11,9 ±1,35 13,8 ±1,10	*0,0283 *0,0035		
42 dias	C- ChPV CASTV ANV	N(4/5); +(1/5)DNS (+/3/5); ++(2/5))* +(4/4)* +(5/5)*	P(3/5) P(3/5)	P(3/5) P(3/5)	5,6 ±0,79 17,9 ±3,39 9,1 ±4,67 10,9 ±2,6	*0,0003 0,241 0,0578							5,1 ±0,69 14,0 ±1,25 11,2 ±5,87 14,1 ±2,73	*0,0126 *0,0166		

Fonte: (NUÑEZ, L. F. N., 2015)

Legenda: C- = Controle Negativo; ChPV = Parvovírus de Galinha; CASTV = Astrovírus de Galinha; ANV = Vírus da Nefrite Aviária; + = Discreta; ++ = Moderada; +++ = Marcante; P = Positivo; DNS = Diferença não significativa; * = Diferença significativa

Tabela 7 - Distribuição dos parâmetros histopatológicos analisados nos fragmentos de jejum, nas aves dos grupos experimentais estudados e nos períodos de análise

Dias da Colheita	Grupo	Mesenterite	Morfologia de Cripta				Lamina Própria				VILO		
			Hiperplasia de Cripta	Abscessos	Necrose	Número de Células em Mitose	Valor P	Folículos Linfóides	Infiltrado de Heterófilos	Infiltrado de Linfócitos	Linfócitos Intra-epitelial	Valor P	
7 dias	C-		N (4/5); +(1/5)			4,4 ±1,26						5,9 ±0,88	
	ChPV		+(4/5); ++(1/5)	P (2/5)	P (4/5)	9,3 ±4,38						7,9 ±4,43	
	CASTV		+(4/5); ++ (1/5)			12,8 ±3,81						22,0 ±4,62	*0,0027
14 dias	ANV	P (1/5)	+(2/5); ++ (3/5)			15,5 ±2,04				*0,0018		16,5 ±3,67	*0,0468
	C-					5,5 ±1,02						3,7 ±1,09	
	ChPV		+(1/5); ++ (4/5)	P (3/5)		8,2 ±2,63						10,3 ±3,21	
21 dias	CASTV		+(5/5)			10,2 ±4,43				*0,0384		10,5 ±2,39	*0,0649
	ANV	P (1/5)	+(2/5); ++ (3/5)			11,7 ±1,87				*0,0031		16,3 ±3,09	*0,0002
	C-					4,9 ±1,12			P (1/5)			10,6 ±0,69	
28 dias	ChPV		+(5/5)			10,2 ±2,93				*0,0173		16,3 ±4,38	*0,0086
	CASTV		+(5/5)			7,7 ±2,58				+(5/5) *		16,5 ±3,78	*0,0080
	ANV	P (1/5)	+(1/5); ++ (4/5)			13,3 ±2,6			P (2/5)			15,5 ±2,67	*0,0225
35 dias	C-					8,1 ±1,36						9,9 ±2,63	
	ChPV		+(1/5); ++ (4/5)	P (1/5)		15,5 ±5,69				*0,0046		15,0 ±5,69	
	CASTV		+(5/5)			12,5 ±4,46				*0,0540		14,0 ±1,41	
42 dias	ANV		+(2/5); ++ (3/5)			9,6 ±1,38						15,6 ±4,12	*0,0172
	C-					8,3 ±1,96						11,1 ±3,67	
	ChPV	P (2/5)	+(3/5); ++ (2/5)			10,2 ±4,02						11,8 ±2,38	
42 dias	CASTV		+(5/5)			11,0 ±1,53						15,6 ±1,64	*0,0625
	ANV		+(3/4); ++(1/4)			8,9 ±1,95						13,8 ±0,19	
	C-					6,1 ±1,48						4,0 ±0,88	
42 dias	ChPV		+(2/5)			9,5 ±2,56						11,8 ±2,33	*0,0389
	CASTV		+(5/5)			12,3 ±3,01				*0,0029		10,9 ±2,87	*0,0653
	ANV		+(5/5)			7,8 ±3,07						14,3 ±2,65	*0,0038

Fonte: (NÚÑEZ, L. F. N., 2015)

Legenda: C- = Controle Negativo; ChPV = Parvovírus de Galinha; CAstV = Astrovírus de Galinha; ANV = Vírus da Nefrite Aviária; + =Discreta; ++ = Moderada; +++ = Marcante; P = Positivo; DNS = Diferença não significativa; * = Diferença significativa

Tabela 8 - Distribuição dos parâmetros histopatológicos analisados nos fragmentos de íleo, nas aves dos grupos experimentais estudados e nos períodos de análise

Dias da Colheita	Grupo:	Mesenterite	Morfologia de Cripta					Lamina Própria			VIL0		
			Hiperplasia de Cripta	Abscessos	Necrose	Número de Células em Mitose	Valor P	Folículos Linfóides	Infiltrado de Heterófilos	Infiltrado de Linfócitos	Linfócitos Intra-epitelial	Valor P	
7 dias	C-					3,6 ±0,38						4,9 ±1,54	
	ChPV		(+(3/5); ++(2/5))*	P(3/5)	P(4/5)	7,7 ±2,81						9,2 ±2,96	*0,0376
	CASTV		+(5/5)*			7,4 ±1,83						7,6 ±0,69	
14 dias	ANV		+(5/5)*			16,7 ±6,79				*0,0017		10,4 ±3,20	*0,0180
	C-					4,6 ±0,69						4,9 ±0,57	
	ChPV		+(2/5); ++(3/5)*	P(2/5)	P(2/5)	11,7 ±2,92						15,3 ±2,96	*0,0032
21 dias	CASTV		+(5/5)			15,3 ±4,69				*0,0025		13,3 ±1,31	*0,0091
	ANV		+(2/5); ++(3/5)*			21,0 ±14,3				*0,008		11,7 ±1,65	
	C-					4,0 ±1,19						3,7 ±0,33	
28 dias	ChPV		+(3/5); ++(2/5)*	P(3/5)	P(5/5)	7,5 ±2,55						11,3 ±1,57	*0,0319
	CASTV		+(3/5); ++(1/5)*			7,3 ±1,48						11,5 ±2,79	*0,0036
	ANV	P(2/5)	+(5/5)*			14,1 ±3,84				*0,0002	+(1/5)DNS	10,8 ±1,46	
35 dias	C-					5,1 ±0,73						3,9 ±1,71	
	ChPV		+(5/5)*		P(1/5)	12,2 ±4,92				*0,0165		10,9 ±1,8	*0,0019
	CASTV		+(5/5)*			12,7 ±2,84				*0,0052		9,0 ±1,8	*0,0614
42 dias	ANV	P(1/4)	+(3/4); +++(1/4))*			10,3 ±0,83					P(2/4)	10,4 ±2,74	*0,0143
	C-					5,7 ±0,89						4,0 ±0,27	
	ChPV		+(3/5); ++(2/5)*			13,0 ±3,41				*0,0016	+(4/5);+(1/5)*	13,8 ±0,38	*0,0166
42 dias	CASTV		+(5/5)*			10,0 ±1,9					P(1/5)	13,1 ±7,67	*0,0511
	ANV		+(1/4); ++(3/4)*			13,1 ±2,06				*0,0023	+(2/4)DNS	8,7 ±1,6	
	C-					4,9 ±0,51					P(2/5)	3,6 ±0,5	
42 dias	ChPV		+(5/5)*			14,3 ±4,86				*0,0031	+(3/5);+(1/5)*	12,1 ±2,5	*0,0133
	CASTV		+(2/4); ++(2/4)*			12,8 ±3,63				*0,0198		10,1 ±3,22	*0,0471
	ANV		+(4/5); ++(1/5)*			10,8 ±4,17					+(2/5)DNS	4,9 ±1,54	*0,0268

Fonte: (NÚNEZ, L. F. N., 2015)

Legenda: C- = Controle Negativo; ChPV = Parvovírus de Galinha; CAstV = Astrovírus de Galinha; ANV = Vírus da Nefrite Aviária; + =Discreta; ++ = Moderada; +++ = Marcante; P = Positivo; DNS = Diferença não significativa; * = Diferença significativa

3.5.4 Detecção e quantificação viral

O ensaio de qPCR para a detecção e quantificação do *ChPV*, mostrou que todos os animais analisados foram positivos para o *ChPV* nos três segmentos do intestino, existindo uma concentração viral alta (20332,7 partículas virais) desde os sétimo dia de idade e mantendo-se até o 21º da infecção. No 22º dia da inoculação ocorreu uma drástica diminuição da concentração de partículas virais, o segmento do intestino que apresentou maior concentração viral maior foi o Íleo seguido pelo Duodeno e Jejunio. A Tabela 9 mostra estes resultados. As amostras obtidas no dia zero e das aves do grupo controle negativo se apresentaram negativas no teste não sendo detectada ou quantificada nenhuma partícula viral.

Tabela 9 - Número de partículas virais do *ChPV* presentes em cada miligrama de tecido

Dias	Numero de Partículas virais por miligrama de tecido					
	Duodeno		Jejunio		Íleo	
7	5078.64	±3730.45	7916.62	±4112.99	6259.65	±4396.83
14	19550.39	±6497.74	16401.05	±3859.81	20332.70	±4701.11
21	3065	±2688	1215.00	±594	8700.00	±3456
28	121.91	±66.45	105.28	±70.18	121.74	±68.98
35	13.47	±3.45	44.92	±31.14	181.80	±117.35
42	5.43	±2.25	16.22	±6.41	12.15	±7.56

Fonte: (NÚÑEZ, L. F. N., 2015)

As aves infectadas com *CAstV* ao serem analisadas com o ensaio de RT-qPCR, proposto no presente trabalho, mostrou que todos os animais analisados foram positivos para o *CAstV* nos três segmentos do intestino, com concentrações virais muito elevadas, ou seja, com 6.739.414 partículas virais, sendo o jejunio, nos primeiros 14 dias da infecção, o segmento que apresentou a maior concentração viral. Este resultado se encontra na Tabela 10. As amostras obtidas no dia zero e o grupo controle negativo se apresentaram negativas no teste não sendo detectada ou quantificada nenhuma partícula viral.

Tabela 10 - Número de partículas virais do *CAstV* presentes em cada miligrama de tecido

Dias	Numero de Partículas virais por miligrama de tecido					
	Duodeno		Jejum		Íleo	
7	273667.44	±40043.954	673941.54	±374691.26	7177.46	±3897.37
14	5367.15	±2744.9	5573.73	±691.694	205.82	±124.25
21	133.96	±59.38	364.47	±203.27	8.17	±3.10
28	264.42	±396.84	6.60	±2.74	13.98	±6.58
35	575.05	±83.4	7.31	±5.19	4.99	±3.17
42	72.79	±94.39	24.48	±22.14	5.89	±2.77

Fonte: (NÚÑEZ, L. F. N., 2015)

O grupo de aves infectadas com *ANV* foi analisado pela RT-qPCR proposta neste trabalho, existindo a presença de *ANV* em todos os animais analisados, nos três segmentos do intestino, desde o sétimo até o 42º dia após a inoculação. A concentração viral foi diminuindo neste período, chegando a apresentar concentrações mínimas de partículas virais. O segmento que apresentou maior carga viral foi o jejuno, com a maior concentração viral no sétimo dia e diminuindo até o 28º dia após a infecção. No 35º dia da infecção o Íleo apresentou a maior concentração de partículas virais. A Tabela 11 mostra estes resultados. As amostras obtidas no dia zero e aquelas do grupo controle negativo se apresentaram negativas no teste não sendo detectada ou quantificada nenhuma partícula viral.

Tabela 11 - Número de partículas virais de *ANV* presentes em cada miligrama de tecido

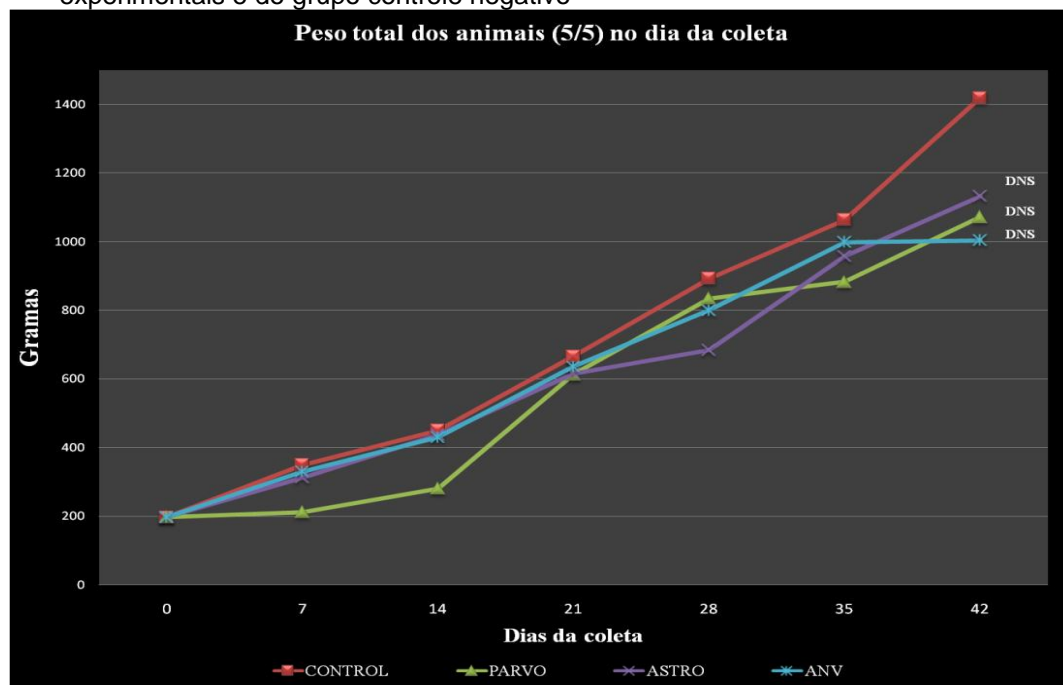
Dias	Numero de Partículas virais por miligrama de tecido					
	Duodeno		Jejum		Íleo	
7	750055.69	±530111.4	2143710.02	±1445578.33	227265.73	±157040.99
14	802.14	±511.61	204763.10	±23408.773	1136.51	±652.89
21	20.64	±19.98	7109.53	±1095.756	11.92	±5.93
28	2.34	±0.12	127.40	±79.19	14.48	±6.86
35	1.11	±0.45	1.90	±1.36	13.28	±5.22
42	2.82	±1.06	2.32	±1.29	0.86	±1.21

Fonte: (NÚÑEZ, L. F. N., 2015)

3.5.5 Peso dos animais

As aves infectadas com *ChPV* mostraram uma ligeira diminuição do peso em relação às aves do grupo controle negativo, cada um dos tempos estudados, mas esta diminuição do peso não foi significativa (valor $p > 0,05$) em nenhum dos tempos estudados. O peso das aves do grupo infectado com *CAstV* mostrou um comportamento similar ao grupo controle negativo aos 7 e 14 dias após a inoculação, do 21º ao 42º da infecção houve uma leve diminuição do peso, sem ser significativa. O resultado do peso das aves do grupo infectado com *ANV* foi semelhante aos encontrados com as aves do grupo infectado com *CAstV*, ou seja, ocorreu uma leve diminuição do peso, sem ser significativa, no 21º, 28º, 35º e 42º dia da inoculação. Estes resultados se encontram na Figura 14.

Figura 14 - Peso total dos animais analisados (5/5) em cada um dos dias da colheita, dos três grupos experimentais e do grupo controle negativo



Fonte: (NÚÑEZ, L. F. N., 2015)

LEGENDA: DNS = Diferença não significativa

Nota: Comparação dos grupos infetados em relação ao grupo controle negativo

4 DISCUSSÃO

Atualmente, a saúde intestinal das aves se constitui um dos principais tópicos em estudo, com ênfase na determinação dos agentes microbiológicos que estariam envolvidos na microbiota nativa ou relacionados com a presença de alterações patológicas no intestino (DAY; ZSAK, 2013; DAY et al., 2015). Alterações na microbiota intestinal por ação de parasitas, fungos, bactérias e vírus faz com que haja um desequilíbrio na saúde intestinal. Os vírus entéricos amplamente difundidos têm muita importância entre as doenças entéricas, afetando o sistema digestório das aves e fazendo com que a eficiência na conversão do alimento em proteína esteja diminuída, prejudicando o investimento dos produtores, aumentando as perdas econômicas (SPACKMAN; DAY; PANTIN-JACKWOOD, 2010; DAY; ZSAK, 2013; ZSAK et al., 2013). O estudo dos vírus entéricos na perda do equilíbrio da microbiota intestinal permitiu se conhecer o comportamento destes vírus no intestino das aves (PANTIN-JACKWOOD; SPACKMAN; WOOLCOCK, 2006; PANTIN-JACKWOOD et al., 2011; DAY; ZSAK, 2013). O estudo dos vírus entéricos na avicultura brasileira é bastante limitado, dessa forma, a patogênese destes vírus nas granjas avícolas nacionais permanecem desconhecidas. No entanto, há relatos da presença de vírus entéricos associados com surtos de doença entérica (METTIFOGO et al., 2014; NUÑEZ et al., 2015a), pois foram detectados astrovírus, rotavírus, reovírus, astrovírus associado a adenovírus no conteúdo intestinal de aves apresentando diarreia, tanto em galinhas (METTIFOGO et al., 2014) como em perus (MOURA-ALVAREZ et al., 2013, 2014). No presente trabalho a caracterização molecular e a determinação da patogenicidade de cepas isoladas de *CAstV*, *ANV* e *ChPV* no Brasil foi realizada, e mostraram que estes vírus entéricos produzem doença entérica caracterizada pela presença de enterite.

O isolamento de vírus entéricos a partir de amostras de fezes se torna difícil porque, em geral, existe associação de diferentes vírus entéricos em uma amostra, portanto pode ocorrer uma competição entre eles, e apenas o vírus mais adaptado consiga propagar e crescer em um determinado hospedeiro, geralmente, adenovírus de galinhas do grupo I (ALEMNEESH et al., 2010), e coronavírus (GUY, 2008) se adaptam

facilmente a vários sistemas hospedeiros. Os três vírus entéricos estudados no presente trabalho foram isolados em ovos embrionados de galinha *SPF*. Os embriões de sete (07) dias de idade inoculados com amostra contendo *CAstV* apresentaram nanismo, hemorragia, edema e deformidades. O vírus também foi isolado em embriões de 14 dias de idade, mas sem apresentar alterações patológicas evidentes, no entanto, usando a microscopia eletrônica foi possível a visualização das partículas virais nos intestinos (NUÑEZ et al., 2015b), mostrando o tropismo deste vírus pelas células intestinais. Uma das cepas virais isoladas foi usada para estudar o comportamento deste vírus como causador de doença entérica, os resultados mostraram que o *CAstV* pode induzir doença entérica e causar alterações patológicas no intestino.

Estudos experimentais usando *CAstV* tem demonstrado que este vírus pode produzir diarreia, sem ocorrer inflamação no intestino (KOCI et al., 2003), condição que parece decorrer do fato da citosina TGF- β estar aumentada, pois esta é uma das citosinas capazes de diminuir a resposta imunológica e estaria modulando a presença de inflamação, outra suposição seria a de que a diarreia ocorreria por um efeito osmótico promovido pelos dissacarídeos e outros nutrientes não absorvidos que atrairiam água para o interior do intestino, alterando os canais iônicos e produzindo diarreia (MOSER; SCHULTZ-CHERRY, 2005). No presente estudo, os animais inoculados com *CAstV* apresentaram diarreia poucas horas após serem inoculados com o vírus, e na avaliação microscópica foi observada uma leve enterite.

Estudos moleculares orientados a determinar a diversidade genética do *CAstV* demonstraram após a análise filogenética e a comparação de sequências do gene precursor da proteína da cápside *ORF 2* a presença de dois grupos, ou seja, o grupo A e o grupo B, onde foram reconhecidos três subgrupos (Ai, Aii e Aiii) no grupo A e dois subgrupos (Bi e Bii) no grupo B (SMYTH et al., 2012). Por outro lado, também foi mostrado quando uma região parcial do gene *ORF 1b*, que é contínua ao gene *ORF 2*, foi analisada que podem ser diferenciados dois grupos o grupo I e o grupo II (SMYTH et al., 2009), onde no grupo I se agrupam sequências do grupo A e no grupo II se agrupam sequências do subgrupo Bi (SMYTH et al., 2012). No presente trabalho, o sequenciamento da região *ORF 1b* contínua a região *ORF 2* mostrou que a sequência

da cepa de *CAstV* usada na infecção experimental e as outras sequências dos isolados brasileiros foram agrupadas no grupo I dos *CAstV*, porém ainda vai ser necessário determinar a qual subgrupo A ou B estes isolados pertencem.

ANV foi primeiramente classificado como um picornavírus e após a sua análise molecular foi classificado como um astrovírus, usando os testes de neutralização viral, neutralização e imunofluorescência indireta foi determinado dois sorotipos o *ANV-1* e o *ANV-2* (SHIRAI et al., 1991). A análise filogenética e molecular do gene *ORF 1b* dos dois sorotipos de *ANV* mostrou que ocorria 69% de similaridade de NT e 71% de identidade de AA entre eles, porém outras análises moleculares de *ANV* de países europeus mostraram a presença de quatro grupos, além dos dois já descritos, classificando os *ANV* nos grupos 1 a 6. A análise molecular da sequência de *ANV* usada na infecção experimental no presente trabalho classificou esta cepa como um *ANV-1*.

Os isolados de *ANV* podem variar em relação ao seu tropismo e patogenicidade, assim o *ANV-1* causa retardo do crescimento e lesões no rim, ou pode causar severa lesão intestinal e diminuição no crescimento após a infecção experimental, com ausência de lesões nos rins, estes resultados sugerem que o *ANV* tem tropismo por diferentes tecidos (DECAESSTECKER et al., 1989; DECAESSTECKER; MEULEMANS, 1989; TODD et al., 2011). Estudos experimentais utilizando o *ANV-1* mostraram uma leve alteração no intestino, apresentando enterócitos degenerados perto da base do vilão, e lesão mais significativa presente no rim das aves infectadas (MAEDA et al., 1979; SMYTH et al., 2007; SHIRAI et al., 2013). O presente estudo demonstrou que a cepa de *ANV-1* usada produz doença entérica e esta mostrou tropismo pelas células intestinais, pois um grande número de partículas virais foram encontradas, principalmente, após setes dias da infecção (Tabela 11). No entanto, serão necessários a análise de outros órgãos, especialmente, o rim, para se conhecer a dinâmica de distribuição deste vírus no organismo.

ChPV está amplamente distribuído no mundo, a caracterização molecular deste vírus foi realizada na análise parcial do gene *NS*, gene que codifica uma proteína não

estrutural que apresenta uma região muito conservada no seu genoma, mostrando que os parvovírus de galinha que estão circulando no mundo compartilham uma grande identidade de nucleotídeos e aminoácidos (ZSAK et al., 2009; DAY; ZSAK, 2010; BIDIN et al., 2011; PALADE et al., 2011; TARASIUK; WOŹNIAKOWSKI; SAMOREK-SALAMONOWICZ, 2012; NUÑEZ et al., 2015a).

A dificuldade no isolamento de *ChPV* torna difícil o seu estudo deste vírus, existem poucas cepas isoladas, como a cepa ABU-1 da Hungria (KISARY, 1985). Recentemente foram descritos o isolamento de três *ChPV* na Korea (KOO et al., 2015), sendo que realizaram o sequenciamento completo do genoma viral, e quando comparados com o isolado de *ChPV* da Hungria, determinaram que havia alta similaridade de NT e AA no gene da proteína não estrutural (*NS*), no entanto, o gene da proteína viral (*VP*) mostrou regiões variáveis (86 % de similaridade). No presente trabalho a análise filogenética e a comparação de NT e AA de parte do gene *VP1/VP2* do isolado Brasileiro com os outros isolados da Korea e da Hungria determinaram que a cepa brasileira pertenceria ao grupo do isolado da Hungria, com o que compartilha altíssima similaridade de AA e NT, mas estes recentes resultados deverão ser confirmados com o sequenciamento completo do isolado Brasileiro.

A dificuldade no isolamento do *ChPV* tem feito que o isolado da Hungria (ABU-1P) seja a cepa usada na maioria dos estudos experimentais envolvendo *ChPV*, sendo que não foram evidenciadas lesões microscópicas no intestino (ZSAK et al., 2013). O isolamento de *ChPV* no Brasil, mostrou que os embriões eram nanicos, hemorrágicos e com deformidades. No presente trabalho, a infecção experimental, usando o isolado brasileiro, foi possível perceber a presença de alterações microscópicas localizadas principalmente na região da cripta, especificamente com a presença de células em necrose e presença de abscessos de cripta.

A síndrome do nanismo e retardo do crescimento (*RSS*) foi descrita pela primeira vez por Olsen (1977), e recebeu vários nomes como a síndrome infecciosa do nanismo, a síndrome da asa pálida, a síndrome da má absorção, a má assimilação e a doença do helicóptero, sendo atribuída a sua etiologia a uma ação viral seguida de uma infecção

secundária por bactérias, junto com deficiências nutricionais, pobres condições de manejo e estresse (SMART et al., 1988; GOODWIN; DAVIS; PLAYER, 1993; MONTGOMERY et al., 1997; OTTO et al., 2006; QUINTEIRO-FILHO et al., 2010), sendo a principal característica da síndrome a presença de diarreia. Vários vírus entéricos como adenovírus, coronavírus, rotavírus, e reovírus foram relacionados com esta síndrome (ELSCHNER et al., 2005; OTTO et al., 2006; PANTIN-JACKWOOD; SPACKMAN; WOOLCOCK, 2006; PANTIN-JACKWOOD et al., 2007; ZSAK et al., 2009, PANTIN-JACKWOOD et al., 2011; METTIFOGO et al., 2014). A análise microscópica do intestino de aves apresentando *RSS* mostraram criptas distendidas, frequentemente com um grande infiltrado de células inflamatórias, células degeneradas e presença de abscessos de cripta (GOODWIN; DAVIS; PLAYER, 1993; SCHUMANN et al., 2009; KANG et al., 2012). O grupo de aves infectadas com *ChPV* apresentou estas lesões com início aos sete dias de idade e se mantendo ao longo do experimento, nos três segmentos do intestino. Uma das características histopatológicas presentes nestas aves foi a presença de células em necrose e degeneração, características de células em condição de necroapoptose. Esta condição é uma forma programada de necrose onde as células podem executar necrose sem ocorrer apoptose, e foi definida como um mecanismo de defesa contra vírus, pois estas células sofrem um suicídio celular (GLOTZER; ENGEL; PETER, 2011; VANDEN BERGHE et al., 2014).

Uma singular alteração presente nas aves infectadas com *ChPV* foi a presença do enrolamento da alça duodenal, observado unicamente neste grupo, em todos os tempos estudados. Esta lesão também foi encontrada em aves de alguns surtos de *RSS*, após a necropsiano laboratório de Ornitopatologia (dados não publicados), onde *ChPV* foi detectado em amostra de intestino. Este resultado sugere que esta alteração duodenal poderia ser uma lesão que indicaria a presença de uma infecção por *ChPV*, sendo uma das possíveis explicações para ocorrer mesenterite na região que une a alça duodenal ao pâncreas e a atrofia de pâncreas estaria desencadeando a presença de esta lesão.

Estudos histopatológicos, em frangos, de casos de campo de animais apresentando *RSS*, mostraram alterações microscópicas no intestino, caracterizadas

por degeneração do vilo, das criptas, de células epiteliais e da lâmina própria, sendo que os animais apresentavam nanismo e retardo do crescimento, com corpos pálidos e sinais de apatia e diarreia, além de pobre empenamento e penas quebradas (QAMAR et al., 2013). No entanto, não foram determinados os agentes etiológicos envolvidos na no quadro clínico e responsável pelas alterações histopatológicas presentes no intestino. A diferença do estudo de Qamar et al (2013) com os três grupos de aves experimentais estudados neste trabalho é que as aves foram infectadas com apenas um dos vírus. Se verificou que estes poderiam desenvolver doença entérica e apresentar as sinais clássicos de doença entérica, principalmente, de diarreia. No entanto, além da desuniformidade no tamanho e o nanismo apresentado, o peso dos animais infectados de todos os grupos experimentais estudados apresentaram uma leve diminuição quando comparados às aves do grupo controle negativo, que não foi significativa, possivelmente, pelo fato da linhagem de aves usadas, uma vez que aves *SPF* não apresentam o mesmo ganho de peso dos frango de corte.

As técnicas moleculares foram fundamentais para a detecção e identificação de patógenos, ensaios de PCR e RT-PCR foram padronizados para a detecção de *CAstV* (DAY; SPACKMAN; PANTIN-JACKWOOD, 2007; SMYTH et al., 2009, SMYTH et al., 2012), para a detecção de *ChPV* (ZSAK et al., 2009) e para a detecção de *ANV*(DAY; SPACKMAN; PANTIN-JACKWOOD, 2007; TODD et al., 2010). Embora estas técnicas sejam muito utilizadas, o uso da PCR em tempo real (qPCR) aumenta a sensibilidade e especificidade na identificação, possibilita a quantificação viral e traz maior versatilidade na identificação molecular, pois mostra em tempo real a amplificação e o resultado final (KUBISTA et al., 2006). No presente estudo, foram propostos três ensaios de qPCR para a detecção e quantificação dos vírus estudados, nos três segmentos do intestino. Os ensaios foram desenvolvidos para a amplificação de regiões bem conservadas dos genes dos vírus em questão, e que poderão ser usados para identificar e quantificar os vírus propostos, estes ensaios moleculares poderão ser usados no diagnóstico laboratorial, o que trará importantes dados sobre o comportamento destes vírus.

Estes ensaios determinaram nos três grupos experimentais estudados, que o vírus esteve presente ao longo do período experimental, e foram encontrados em maior

concentração no sétimo dia após a infecção, diminuindo à medida que os dias transcorriam, ou seja, até o 42º dia. Esta cinética de quantificação viral pode estar mostrando que o período de maior multiplicação do vírus poderia acontecer no sétimo dia após a infecção, porém mais estudos terão que ser feitos para se determinar se nas primeiras 24 horas da infecção esta concentração viral poderia estar aumentada e ter uma relação com a presença dos sinais clínicos de doença entérica, ou seja, de diarreia.

Considerando a brusca diminuição no número de partículas virais após a primeira semana de infecção e que se manteve ao longo do experimento, é possível que este resultado seja devido à excreção destes vírus pelas fezes, ou que após uma viremia podem ter encontrado sítios de replicação em outros órgãos, onde poderiam estar se multiplicando e causando outras alterações patológicas associadas a estes vírus. Estudos envolvendo *CAstV* relataram outras alterações como os surtos de gota, em frangos, produzindo uma nefrite intersticial, deposição de uratos nos rins e no coração (BULBULE et al., 2013; SMYTH et al., 2013). Como *ANV* foi associado com doença renal, no presente estudo este órgão poderia também estar comprometido além da alteração intestinal. *ChPV* foi associado com hipoplasia cerebelar e hidrocefalia em frangos de corte (MARUSAK et al., 2010), assim, é possível que este vírus também possa se replicar em outros órgãos além do intestino. Dessa forma, novos estudos serão necessários para se conhecer a patogêneses destes vírus.

Estudos experimentais com o isolado da Hungria de *ChPV* usando como inoculo uma concentração viral de 10^6 mostraram animais com sinais de doença entérica com evidencia de diarreia, mas sem a presença de alterações microscópicas no intestino (ZSAK et al., 2013), no presente estudo os animais do grupo infectado com o *ChPV* recebeu um número de partículas menor do que no referente estudo (14^4 partículas virais) e mostraram animais com sinais clínicos de doença entérica como diarreia e presença de lesões microscópicas significativas. Este resultado sugere que a cepa do isolado brasileiro poderia ter um potencial de patogenicidade maior, porque foi capaz de causar lesão evidente no intestino.

Os vírus entéricos possuem uma grande diversidade genética, dessa forma o uso de tecnologias de sequenciamento de segunda e terceira geração para a análise de DNA permitirá que sequências completas possam ser geradas, e em consequência realizar comparações de genes completos e determinar a relação filogenética destes genes.

A infecção experimental determinou que cada um dos vírus estudados foram eficientes e produziram doença entérica, com os sinais clínicos da síndrome do nanismo e retardo do crescimento, causando alteração entérica, mostrando a importância destes vírus na saúde das aves. No entanto, mais estudos devem ser desenvolvidos para se determinar a relação dos vírus estudados em outros órgãos.

5 CONCLUSÕES

- A cepa do isolado brasileiro de *CAstV* usada no presente trabalho foi classificada pela análise do cDNA como um astrovírus de galinha do grupo I.
- A cepa do isolado brasileiro de *ANV* estudada no presente trabalho foi classificada molecularmente como um *ANV-1*.
- O isolado brasileiro de *ChPV* foi geneticamente relacionada com o isolado da Hungria ABU-1P.
- O isolado brasileiro de *ANV* e *CAstV* inoculado por via oral, produz doença entérica com presença de alterações microscópicas caracterizadas por enterite.
- O isolado brasileiro de *ChPV* administrado por via oral, produz doença entérica com presença de abscessos de cripta, necrose das células da cripta e presença de enterite.
- Os vírus estudados *CAstV*, *ANV* e *ChPV* podem permanecer no intestino por um período de 42 dias após a infecção experimental de aves *SPF*.
- O maior número de partículas virais se encontra aos sete dias após a infecção com *CAstV* e *ANV*, e aos catorze dias após a infecção com o *ChPV*.
- A infecção experimental com o isolado brasileiro de *ChPV* produz o enrolamento da alça duodenal.
- O ensaio de PCR em tempo real (qPCR) para o *ChPV* é sensível e específico para a detecção e quantificação do vírus

- Os ensaios de RT-PCR em tempo real (RT-qPCR) para o *CAstV* e *ANV* são sensíveis e específicos para a detecção individual de cada um dos vírus.
- Os ensaios de qPCR e RT-qPCR propostos podem ser uma alternativa rápida e eficaz no diagnóstico de rotina do *CAstV*, *ANV* e *ChPV*.

REFERÊNCIAS

- ALEMNESH, W.; HAIR-BEJO, M.; AINI, I.; OMAR, a R. Pathogenicity of fowl adenovirus in specific pathogen free chicken embryos. **Journal of Comparative Pathology**, v. 146, p. 223–229, 2010.
- BAXENDALE, W.; MEBATSION, T. The isolation and characterisation of astroviruses from chickens. **Avian Pathology**, v. 33, n. 3, p. 364–370, 2004.
- 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. (Ed.). **Fields Virology**. 5. ed. Boston State: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. p. 2356–2394.
- BIDIN, M.; LOJKIĆ, I.; BIDIN, Z.; TILJAR, M.; MAJNARIĆ, D. Identification and phylogenetic diversity of parvovirus circulating in commercial chicken and turkey flocks in Croatia. **Avian Diseases**, v. 55, n. 4, p. 693–696, 2011.
- BULBULE, N. R.; MANDAKHALIKAR, K. D.; KAPGATE, S. S.; DESHMUKH, V. V.; SCHAT, K. A.; CHAWAK, M. M. Role of chicken astrovirus as a causative agent of gout in commercial broilers in India. **Avian Pathology**, v. 42, n. 5, p. 464–473, 2013.
- CARRATALÀ, A.; RUSINOL, M.; HUNDESA, A.; BIARNES, M.; RODRIGUEZ-MANZANO, J.; VANTARAKIS, A.; KERN, A.; SUÑEN, E.; GIRONES, R.; BOFILL-MAS, S. A novel tool for specific detection and quantification of chicken/turkey parvoviruses to trace poultry fecal contamination in the environment. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 20, p. 7496–7499, 2012.
- DAY, J. M.; OAKLEY, B. B.; SEAL, B. S.; ZSAK, L. Comparative analysis of the intestinal bacterial and RNA viral communities from sentinel birds placed on selected broiler chicken farms. **PLoS One**, v. 10, n. 1, p. 1–15, 2015.
- DAY, J. 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, n. 3, p. 681–684, 2007.
- DAY, J. M.; ZSAK, L. Determination and analysis of the full-length chicken parvovirus genome. **Virology**, v. 399, n. 1, p. 59–64, 30 mar. 2010.
- DAY, J. M.; ZSAK, L. Recent Progress in the Characterization of Avian Enteric Viruses. **Avian Diseases**, v. 57, p. 573–580, 2013.
- DE BENEDICTIS, P.; SCHULTZ-CHERRY, S.; BURNHAM, A.; CATTOLI, G. Astrovirus infections in humans and animals - molecular biology, genetic diversity, and interspecies transmissions. **Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases**, v. 11, n. 7, p. 1529–44, 2011.

- DECAESSTECKER, M.; CHARLIER, G.; PEETERS, J.; MEULEMANS, G. Pathogenicity of fowl enteroviruses. **Avian Pathology**, v. 18, p. 697–713, 1989.
- DECAESSTECKER, M.; MEULEMANS, G. Antigenic relationships between fowl enteroviruses. **Avian Pathology**, v. 18, n. 4, p. 715–23, out. 1989.
- DOMANSKA-BLICHAZ, K.; JACUKOWICZ, A.; LISOWSKA, A.; MINTA, Z. Genetic characterization of parvoviruses circulating in turkey and chicken flocks in Poland. **Archives of Virology**, v. 157, p. 2425 – 2430, 2012.
- ELSCHNER, M.; HOTZEL, H.; REETZ, J.; DILLER, R.; OTTO, P. Isolation, identification and characterization of group A rotavirus from a chicken: the inner capsid protein sequence shows only a distant phylogenetic relationship to most other avian group A rotaviruses. **Journal of Veterinary Medicine.**, v. 52, n. 5, p. 211–213, 2005.
- GLOTZER, S. C.; ENGEL, M.; PETER, M. E. Apoptosis meets necrosis. **Nature**, v. 471, p. 310–312, 2011.
- GOODWIN, M. A.; DAVIS, J. F.; PLAYER, E. C. Reovirus-Associated Enteritis in Georgia Broiler Chicks. **Avian Diseases**, v. 37, n. 1, p. 229–233, 1993.
- GUY, J. S. Virus infections of the gastrointestinal tract of poultry. **Poultry Science**, v. 77, n. 8, p. 1166–1175, 1998.
- GUY, J. S. Isolation and propagation of coronaviruses in embryonated eggs. **Methods in Molecular Biology**, v. 454, p. 109–117, 2008.
- HEWSON, K. A.; O'ROURKE, D.; NOORMOHAMMADI, A. H. Detection of Avian Nephritis Virus in Australian Chicken Flocks. **Avian Diseases**, v. 54, n. 3, p. 990–993, 2010.
- HUEFFER, K.; PARRISH, C. R. Parvovirus host range, cell tropism and evolution. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, n. 4, p. 392–8, 2003.
- IMADA, A. T.; TANIGUCHI, T.; YAMAGUCHI, S.; MINETOMA, T.; MAEDA, M.; KAWAMURA, H.; IMADA, T. Susceptibility of chickens to avian nephritis virus at various inoculation routes and ages. **Avian Diseases**, v. 25, n. 2, p. 294–302, 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.
- JACUKOWICZ, A. C. A.; BOCIAN, A. L.; A, Z. M.; DOMAN, K. Research Note — Astroviruses in Polish Commercial Turkey Farms in 2009 – 2012. **Avian Diseases**, v. 58, n. 5, p. 158–164, 2014.

JINDAL, N.; PATNAYAK, D. P.; CHANDER, Y.; ZIEGLER, A. F.; GOYAL, S. M. Detection and molecular characterization of enteric viruses from poult enteritis syndrome in turkeys. **Poultry Science**, v. 89, n. 2, p. 217–226, 2010.

KANG, K.-I.; EL-GAZZAR, M.; SELLERS, H. S.; DOREA, F.; SUSAN, M.; KIM, T.; COLLETT, S.; MUNDT, E. Investigation into the aetiology of runting and stunting syndrome in chickens. **Avian Pathology**, v. 41, n. 1, p. 41–50, 2012.

KISARY, J. Experimental infection of chicken embryos and day-old chickens with parvovirus of chicken origin. **Avian Pathology**, v. 14, n. 1, p. 1–7, 1985.

KISARY, J.; AVALOSSE, B.; MILLER-FAURES, A.; ROMMELAERE, J. The genome structure of a new chicken virus identifies it as a parvovirus. **The Journal of General Virology**, v. 66, p. 2259–2263, 1985.

KISARY, J.; NAGY, B.; BITAY, Z. Presence of parvoviruses in the intestine of chickens showing stunting syndrome. **Avian Pathology**, v. 13, n. 2, p. 339–343, 1984.

KOCI, M. D.; MOSER, L. A.; KELLEY, L. A.; LARSEN, D.; BROWN, C. C.; SCHULTZ-CHERRY, S. Astrovirus Induces Diarrhea in the Absence of Inflammation and Cell Death. **Journal of Virology**, v. 77, n. 21, p. 11798–11808, 2003.

KOCI, M. D.; SCHULTZ-CHERRY, S. Avian astroviruses. **Avian Pathology**, v. 31, n. February 2012, p. 213–227, 2002.

KOO, B.-S.; LEE, H.-R.; JEON, E.-O.; HAN, M.-S.; MIN, K.-C.; LEE, S.-B.; BAE, Y.-J.; CHO, S.-H.; MO, J.-S.; KWON, H. M.; SUNG, H. W.; KIM, J.-N.; MO, I.-P. Genetic characterization of three novel chicken parvovirus strains based on analysis of their coding sequences. **Avian Pathology**, v. 44, n. 1, p. 28–34, 2015.

KOO, B.-S.; LEE, H.-R.; JEON, E.-O.; JANG, H.-S.; HAN, M.-S.; MO, I.-P. An unusual case of concomitant infection with chicken astrovirus and group A avian rotavirus in broilers with a history of severe clinical signs. **Journal of Veterinary Science**, v. 14, n. 2, p. 231–3, 2013.

KUBISTA, M.; ANDRADE, J. M.; BENGTSSON, M.; FOROOTAN, A.; JONÁK, J.; LIND, K.; SINDELKA, R.; SJÖBACK, R.; SJÖGREEN, B.; STRÖMBOM, L.; STÅHLBERG, A.; ZORIC, N. The real-time polymerase chain reaction. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, n. 2-3, p. 95–125, 2006.

MAEDA, A. M.; IMADA, T.; TANIGUCHI, T.; HORIUUCHI, T. Pathological Changes in Chicks Inoculated with the Picornavirus “ Avian Nephritis Virus ”. **Avian Diseases**, v. 23, n. 3, p. 589–596, 1979.

MAONDEZ, E.; ARIAS, C. A. Astroviruses. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Ed.). **Fields Virology**. 5. ed. Boston State: 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, n. 1, p. 156–160, 2010.

- METTIFOGO, E.; NUÑEZ, L. F. N.; CHACÓN, J. L.; SANTADER-PARRA, S. H.; ASTOLFI-FERREIRA, C. S.; JEREZ, J. A.; JONES, R. C.; FERREIRA, A. J. P. Emergence of Enteric Viruses in Production Chickens is a Concern for Avian Health. **The Cientific World Journal**, p. 1–8, 2014.
- 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.
- MOSER, L. A.; SCHULTZ-CHERRY, S. Pathogenesis of astrovirus infection. **Viral Immunology**, v. 18, n. 1, p. 4–10, 2005.
- MOURA-ALVAREZ, J.; CHACON, J. V.; SCANAVINI, L. S.; NUÑEZ, L. F. N.; ASTOLFI-FERREIRA, C. S.; JONES, R. C.; PIANTINO FERREIRA, A. J. Enteric viruses in Brazilian turkey flocks: Single and multiple virus infection frequency according to age and clinical signs of intestinal disease. **Poultry Science**, v. 92, n. 4, p. 945 – 955, 2013.
- MOURA-ALVAREZ, J.; NUÑEZ, L. F. N.; ASTOLFI-FERREIRA, C. S.; KNÖBL, T.; CHACÓN, J. L.; MORENO, A. M.; JONES, R. C.; FERREIRA, A. J. P. Detection of enteric pathogens in Turkey flocks affected with severe enteritis, in Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, v. 46, n. 6, p. 1051–1058, 2014.
- NARITA, M.; KAWAMURA, H.; NAKAMURA, K.; SHIRAI, J.; FURUTA, K.; ABE, F. An immunohistological study on the nephritis in chicks experimentally produced with avian nephritis virus. **Avian Pathology**, v. 19, n. 3, p. 497–509, 1990.
- NIGHOT, P. K.; MOESER, A.; ALI, R. A.; BLIKSLAGER, A. T.; KOZI, M. D. Astrovirus infection induces sodium malabsorption and redistributes sodium hydrogen exchanger expression. **Virology**, v. 401, n. 2, p. 146–154, 2010.
- NUÑEZ, L. F. N. **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.
- NUÑEZ, L. F. N.; METTIFOGO, E.; SANTANDER-PARRA, S. H.; ASTOLFI-FERREIRA, C. S.; FERREIRA, A. J. P. Isolation and molecular characterisation of chicken parvovirus from Brazilian flocks with enteric disorders. **British Poultry Science Journal**, v. 56, n. 1, p. 39–47, 2015a.
- NUÑEZ, L. F. N.; PARRA, S. H. S.; METTIFOGO, E.; CATROXO, M. H. B.; ASTOLFI-FERREIRA, C. S.; FERREIRA, A. J. P. Isolation of chicken astrovirus from specific pathogen-free chicken embryonated eggs. **Poultry Diagnostic and Research Center**, v. 94, n. 5, p. 947–954, 2015b.
- NUÑEZ, L. F. N.; PIANTINO FERREIRA, a. J. Viral agents related to enteric disease in commercial chicken flocks, with special reference to Latin America. **World's Poultry Science Journal**, v. 69, n. 04, p. 853–864, 2013.

OLSEN, D. Isolation of a reovirus-like agent from broiler chicks with diarrhea and stunting. In: the 26th Western Poultry Diseases Conference, 131-139. 1977, Sacramento. **Proceedings...** California-United States: UCDAVIS, 1977.

OTTO, P.; LIEBLER-TENORIO, E. M.; ELSCHNER, M.; REETZ, J.; LÖHREN, U.; DILLER, R. Detection of rotaviruses and intestinal lesions in broiler chicks from flocks with runting and stunting syndrome (RSS). **Avian Diseases**, v. 50, n. 3, p. 411–418, 2006.

PALADE, E. A.; KISARY, J.; BENYEDA, Z.; MÁNDOKI, M.; BALKA, G.; JAKAB, C.; VÉGH, 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.; DAY, J. M.; JACKWOOD, M. W.; SPACKMAN, E. Enteric viruses detected by molecular methods in commercial chicken and turkey flocks in the United States between 2005 and 2006. **Avian Diseases**, v. 52, n. 2, p. 235–244, 2008.

PANTIN-JACKWOOD, M. J.; SPACKMAN, A. C. E.; DAY, A. 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, n. 3, 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, n. 3, p. 397–404, 2006.

PANTIN-JACKWOOD, M. J.; STROTHER, K. O.; MUNDT, E.; ZSAK, L.; DAY, J. M.; SPACKMAN, E. Molecular characterization of avian astroviruses. **Archives of Virology**, v. 156, n. 2, p. 235–244, 2011.

QAMAR, F. M.; ASLAM, H.; JAHAN, N. histopathological studies on RSS in broilers, Lahore Pakistan.pdf. **Veterinary Medicine International**, p. 1–6, 2013.

QUINTEIRO-FILHO, W. M.; RIBEIRO, A.; FERRAZ-DE-PAULA, V.; PINHEIRO, M. L.; SAKAI, M.; SÁ, L. R. M.; FERREIRA, A. J. P.; PALERMO-NETO, J. Heat stress impairs performance parameters, induces intestinal injury, and decreases macrophage activity in broiler chickens. **Poultry Science**, v. 89, n. 9, p. 1905–1914, 2010.

SCHULTZ-CHERRY, A. S.; KAPCZYNSKI, D. R.; SIMMONS, V. M.; KOCI, M. D.; BROWN, C.; BARNES, H. J.; SIMMONS, A. V. M.; SCHULTZ-CHERRY, S.; BARNES, H. J. Identifying Agent (s) Associated with Poult Enteritis Mortality Syndrome : Importance of the Thymus. **Avian Diseases**, v. 44, n. 2, p. 256–265, 2015.

SCHUMANN, T.; HOTZEL, H.; OTTO, P.; JOHNE, R. Evidence of interspecies transmission and reassortment among avian group A rotaviruses. **Virology**, v. 386, n. 2, p. 334–343, 2009.

SHIRAI, A. J.; NAKAMURA, K.; SHINOHARA, K.; KAWAMURA, H. Pathogenicity and antigenicity of avian nephritis isolates. **Avian Diseases**, v. 35, n. 1, p. 49–54, 1991.

- SHIRAI, A. J.; TANIMURA, N.; URAMOTO, K.; NARITA, M.; NAKAMURA, K.; KAWAMURA, H. Pathologically and Serologically Different Avian Nephritis Virus Isolates Implicated in Etiology of Baby Chick Nephropathy. **Avian Diseases**, v. 36, n. 2, p. 369–377, 2013.
- SHIRAI, J.; NAKAMURA, K.; NARITA, M.; FURUTA, K.; KAWAMURA, H. Avian nephritis virus infection of chicks: virology, pathology, and serology. **Avian Diseases**, v. 34, n. 3, p. 558–565, 1990.
- SMART, I. J.; BARR, D.; REECE, R. L.; FORSYTH, W. M.; EWING, I. Experimental reproduction of the runting-stunting syndrome of broiler chickens. **Avian Pathology**, v. 17, n. 3, p. 617–627, 1988.
- SMYTH, J. ; CONNOR, T. J.; MCNEILLY, F.; MOFFET, D. A.; CALVERT, V. M.; MCNULTY, M. S. Studies on the pathogenicity of enterovirus-like viruses in chickens. **Avian Pathology**, v. 36, n. 2, p. 119–126, 2007.
- SMYTH, V. J.; JEWHRST, H. L.; ADAIR, B. M.; TODD, D. Detection of chicken astrovirus by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. **Avian Pathology**, v. 38, p. 293–299, 2009.
- SMYTH, V. J.; JEWHRST, H. L.; WILKINSON, D. S.; ADAIR, B. M.; GORDON, A. W.; TODD, D. Development and evaluation of real-time TaqMan® RT-PCR assays for the detection of avian nephritis virus and chicken astrovirus in chickens. **Avian Pathology**, v. 39, n. 6, p. 467–474, 2010.
- SMYTH, V. J.; TODD, D.; TRUDGETT, J.; LEE, A.; WELSH, M. D. Capsid protein sequence diversity of chicken astrovirus. **Avian Pathology**, v. 41, n. 2, p. 151–159, 2012.
- SMYTH, V.; TRUDGETT, J.; WYLIE, M. Chicken astrovirus detected in hatchability problems associated with “white chicks”. **Veterinary Record**, v. 173, p. 403–404, 2013.
- SPACKMAN, D.; GOUGH, R.; COLLINS, M.; LANNING, D. Isolation of an enterovirus-like agent from the meconium of dead-in-shell chicken embryos. **Veterinary Record**, v. 114, n. 9, p. 216–218, 1984.
- SPACKMAN, E.; DAY, J. M.; PANTIN-JACKWOOD, M. J. Astrovirus, Reovirus, and Rotavirus Concomitant Infection Causes Decreased Weight Gain in Broad-Breasted White Poults. **Avian Diseases**, v. 54, n. 1, p. 16–21, 2010.
- TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, n. 10, p. 2731–2739, 2011.
- TARASIUK, K.; WOŹNIAKOWSKI, G.; SAMOREK-SALAMONOWICZ, E. Occurrence of chicken parvovirus infection in poland. **The Open Virology Journal**, v. 6, p. 7–11, 2012.
- 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.

TODD, D.; TRUDGETT, J.; SMYTH, V. J.; DONNELLY, B.; MCBRIDE, N.; WELSH, M. D. Capsid protein sequence diversity of avian nephritis virus. **Avian Pathology**, v. 40, n. 3, p. 249–259, 2011.

TODD, D.; WILKINSON, D. S.; JEWHRST, H. L.; WYLIE, M.; GORDON, A. W.; ADAIR, B. M. A seroprevalence investigation of chicken astrovirus infections. **Avian Pathology**, v. 38, n. 4, p. 301–319, 2009.

VANDEN BERGHE, T.; LINKERMANN, A.; JOUAN-LANHOUE, S.; WALCZAK, H.; VANDENABEELE, P. Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. **Nature Reviews**, v. 15, n. 2, p. 135–147, 2014.

YAMAGUCHI, A. S.; IMADA, T.; KAWAMURA, H. Characterization of a Picornavirus Isolated from Broiler Chicks. **Avian Diseases**, v. 23, n. 3, p. 571–581, 1977.

ZSAK, L.; CHA, R. M.; DAY, J. M.; CHA, A. R. M. Chicken parvovirus-induced runting-stunting syndrome in young broilers. **Avian Diseases**, v. 57, n. 1, p. 123–127, 2013.

ZSAK, L.; STROTHER, K. O.; DAY, J. M.; STROTHER, A. K. O. Development of a Polymerase Chain Reaction Procedure for Detection of Chicken and Turkey Parvoviruses. **Avian Diseases**, v. 53, n. 1, p. 83–88, 2009.