

SILVANA HIPATIA SANTANDER PARRA

**Isolamento em ovos embrionados e cultura celular do vírus da
Laringotraqueíte Infecciosa e a padronização de um PCR em Tempo
Real para a detecção do gene ICP4 deste vírus**

São Paulo

2016

SILVANA HIPATIA SANTANDER PARRA

**Isolamento em ovos embrionados e cultura celular do vírus da
Laringotraqueíte Infecciosa e a padronização de um PCR em Tempo Real para
a detecção do gene ICP4 deste vírus**

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

Departamento:

Patologia

Área de concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientador:

Prof. Dr. Antônio José Piantino Ferreira

São Paulo

2016

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.3404
FMVZ

Parra, Silvana Hipatia Santander
Isolamento em ovos embrionados e cultura celular do vírus da Laringotraqueíte
Infecciosa e a padronização de um PCR em Tempo Real para a detecção do gene ICP4
deste vírus / Silvana Hipatia Santander Parra. -- 2016.
115 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2016.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Prof. Dr. Antônio José Piantino Ferreira.

1. LTI. 2. PCR. 3. Isolamento. 4. Detecção molecular. 5. Caracterização. I. Título.



Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Isolamento em ovos embrionados e cultura celular do vírus da Laringotraqueíte Infecciosa e a padronização de uma PCR em Tempo Real para a detecção do gene ICP4 deste vírus", protocolado sob o nº 2674/2012, utilizando 600 (seiscentos) ovos embrionados, sob a responsabilidade do(a) Prof. Dr. Antonio José Piantino Ferreira, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 20/6/2012.

We certify that the Research "Isolation in embryonated eggs and cell culture of Infectious Laryngotracheitis virus and the standardization of real-time PCR for the detection of ICP4 gene of this virus", protocol number 2674/2012, utilizing 600 (six hundred) embryonated eggs, under the responsibility Prof. Dr. Antonio José Piantino Ferreira, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 6/20/2012.

São Paulo, 21 de junho de 2012.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: SANTANDER PARRA, Silvana Hipatia

Título: **Isolamento em ovos embrionados e cultura celular do vírus da Laringotraqueíte Infecciosa e a padronização de um PCR em Tempo Real para a detecção do gene ICP4 deste vírus**

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 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 fue mi mejor ejemplo de lucha y superación que me demostró que todo obstáculo puede ser superado y me brindó todo su apoyo en todas las decisiones que tomé.

A mi mamá Yola que siempre cuidó de mí y me brindó todo el amor que tiene sin esperar nada a cambio.

A Luis que me brindó todo su amor y apoyo incondicional.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Antonio José Piantino Ferreira por ter acreditado em mim e pela acolhida no Laboratório.

A Claudete Serrano Astolfi Ferreira, pela amizade que me brindou todos estes anos, pela confiança que sempre depositou em mim e por todos os momentos de alegria que compartilhamos.

Ao Marcos Buim pelo apoio e facilitação do equipamento utilizado na investigação.

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

A Luis pelo apoio e ajuda no desenvolvimento durante toda a investigação.

A mi segunda família (Doña Lourdes, Luisi, Anita, Joaquín, Pedrito, David, Nelly, Danielita, Matias) por todo el apoyo que me brindaron a pesar de la distancia que nos separa.

A Maria Eugenia, a Bim e ao Dennis pela amizade que me brindaram quando cheguei ao laboratório.

A Vera a amiga que encontrei em São Paulo por todos os gratos momentos compartilhados.

Ao David, Cristina e Emilio pela amizade y momentos agradáveis que compartilhamos.

Aos meus colegas do Laboratório Ruy e Natália pela convivência.

Ao Mauricio pela presteza e ajuda na preparação dos materiais e insumos utilizados na investigação e pela amizade brindada.

A Cris e a Milena pela ajuda brindada sempre que precisei.

A FMVZ USP e ao VPT pela oportunidade brindada para fortalecer e aprimorar os meus conhecimentos.

Ao pessoal de segurança (Luizão (+), Sr. Garcia, Becker, Sr. Guimaraes, Marcos, Rosinha) pela amizade ao longo destes anos.

Ao pessoal da Pós-graduação pela ajuda brindada.

A Elza Maria Rosa Bernardo Faquim da Biblioteca da FMVZ-USP, pela agilidade e prontidão na revisão do trabalho.

Ao CAPES e CNPq (Processo 140744/2014-2) pela ajuda financeira concedida para a realização deste doutorado.

A banca examinadora por terem aceitado o convite.

Nossa maior fraqueza está em desistir. O caminho mais certo de vencer é tentar mais uma vez.

Thomas Edison

RESUMO

SANTANDER PARRA, S. H. **Isolamento em ovos embrionados e cultura celular do vírus da Laringotraqueíte Infecciosa e a padronização de um PCR em Tempo Real para a detecção do gene ICP4 deste vírus.** [Isolation in embryonated eggs and cell culture of infectious laryngotracheitis virus and standardization of Real Time PCR to detect ICP4 gene of this virus]. 2016. 115 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

A Laringotraqueíte Infecciosa (LTI) é uma doença respiratória altamente contagiosa, que acomete principalmente galinhas, é causada por um *Gallid herpesvirus tipo 1*. As aves infectam-se através do trato respiratório e por via ocular, sendo as aves com infecção clínica as principais transmissoras do vírus. Outras fontes de transmissão são as aves com infecções latentes, materiais de cama e fômites contaminados. Os sinais clínicos geralmente aparecem entre 6 a 12 dias da exposição natural e em infecções experimentais entre 4 a 7 dias pós infecção (p.i). Na forma subclínica pode-se observar uma leve traqueíte mucoide, sinusite, conjuntivite, com morbidade variável e baixa mortalidade. Na forma severa, as aves apresentam depressão, dispneia, espirros, corrimento nasal, conjuntivite, expectoração de secreção sanguinolenta. A taxa de morbidade é alta, comprometendo 100% do lote e a mortalidade pode ocorrer em até 70% do plantel, embora taxas de 10 a 20% sejam as mais frequentes. O agente causador desta doença pode ser propagado na membrana corio-alantóide (MCA) de embriões de frango em desenvolvimento e replicado em células de rim de frangos adultos, como também, em uma variedade de células epiteliais de embrião como do rim, do fígado e do pulmão. Existem vários procedimentos para o diagnóstico da LTI como: a observação de sinais clínicos, a observação de lesões macroscópicas e lesões histopatológicas e o uso de técnicas moleculares como: RFLP, PCR e PCR em tempo real. Como a PCR em tempo real apresenta uma maior sensibilidade quando comparada com outros métodos de diagnóstico, permite quantificar o número de cópias amplificadas do genoma viral, assim como, a diferenciação da doença na fase aguda ou crônica, reduzindo o número de possíveis falsos positivos, esta foi usada para a detecção deste vírus. O objetivo deste trabalho foi isolar o VLTI em ovos embrionados, descrever as lesões

macroscópicas causadas pelo vírus, detectar o vírus pela reação de PCR em tempo real, usando como alvo da reação o gene ICP4, padronizar uma reação de PCR em Tempo Real usando a glicoproteína E como alvo da reação e propor o seu uso no diagnóstico de rotina.

Palavras-chave: LTI. PCR. Isolamento. Detecção molecular. Caracterização.

ABSTRACT

SANTANDER PARRA, S. H. **Isolation in embryonated eggs and cell culture of infectious laryngotracheitis virus and standardization of Real Time PCR to detect ICP4 gene of this virus.** [Isolamento em ovos embrionados e cultura celular do vírus da Laringotraqueíte Infecciosa e a padronização de um PCR em Tempo Real para a detecção do gene ICP4 deste vírus]. 2016. 115 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

The Infectious Laryngotracheitis (ILT) is a highly contagious respiratory disease that affects mainly chickens; caused by a *Gallid herpesvirus type 1*. Infect birds, by the respiratory tract and by the ocular route, the birds with clinical infection the main transmission of the virus. Other transmission sources are birds with latent infections, bedding materials and contaminated fomites. Clinical signs generally appear between 6 to 12 days exposure of the natural and in experimental infections between 4 and 7 days post infection (p.i). In subclinical form can observe a slight mucoid tracheitis, sinusitis, conjunctivitis, variable morbidity and low mortality. In the severe form, the birds present depression, dyspnea, sneezing, nasal discharge, conjunctivitis, expectoration of bloody discharge. The morbidity rate is high, impairing the lot 100% and mortality may occur in up to 70% of the flock, although 10 to 20% rates are the most frequent. The causative agent of this disease can be propagated in chorioallantoic membrane (CAM) of chicken embryos develop and replicated in adult chicken kidney cells as well as in a variety of epithelial-cell embryo as kidney, liver and lung. There are several procedures for the diagnosis of LTI as observation of clinical signs, observation of gross lesions and histopathological lesions, and the use of molecular techniques as RFLP, PCR and real time PCR. As the real-time PCR has greater sensitivity compared to other diagnostic methods to quantify the number of amplified copies of the viral genome, as well as the differentiation of the disease in the acute or chronic phase, reducing the number of potential false positives, this was used for detection of virus. The objective of this study was to isolate the VLTI in embryonated eggs, describe macroscopic lesions caused by the virus, detect the virus by PCR reaction in real time, using as a target of reaction the ICP4 gene,

standardize a PCR reaction in real time using the glycoprotein E as a target of reaction and propose their use in routine diagnosis.

Keywords: ILT. PCR. Isolation. Molecular Detection. Characterization.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	17
2	EPIDEMIOLOGIA DA LARINGOTRAQUEÍTE INFECCIOSA AVIÁRIA COM ESPECIAL ENFOQUE NA AMÉRICA DO SUL: UMA ATUALIZAÇÃO.....	19
2.1	INTRODUÇÃO.....	19
2.2	DESCRIÇÃO DO AGENTE E DA DOENÇA.....	20
2.2.1	Etiologia.....	20
2.2.2	Susceptibilidade a agentes físicos e químicos.....	20
2.2.3	Sistemas de laboratório hospedeiros.....	21
2.2.4	Hospedeiros.....	22
2.2.5	Transmissão.....	22
2.2.6	Infecção aguda e latente.....	23
2.2.7	Sinais clínicos.....	24
2.2.8	Lesões.....	24
2.2.9	Resposta imune.....	25
2.2.10	Vacinação.....	26
2.2.11	Diagnóstico.....	28
2.2.12	Histopatologia.....	28
2.2.13	Isolamento viral.....	29
2.2.14	Detecção do vírus através de outras técnicas.....	30
2.2.15	Diagnóstico diferencial.....	31
2.2.16	Prevenção.....	31
2.2.17	Tratamento.....	32
2.3	LTI SITUAÇÃO EM AMÉRICA DO SUL.....	32
2.3.1	Brasil.....	32

2.3.2	Argentina.....	34
2.3.3	Peru.....	34
2.3.4	Equador.....	35
2.3.5	Bolívia.....	35
2.4	CONCLUSÃO.....	36
	REFERÊNCIAS.....	37
3	DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO VÍRUS DA LARINGOTRAQUEÍTE INFECCIOSA (VLTi) EM AVES COM PROBLEMAS RESPIRATÓRIOS	50
3.1	INTRODUÇÃO.....	50
3.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	51
3.2.1	Amostras virais.....	51
3.2.2	Extração do DNA viral das amostras.....	52
3.2.3	Triagem das amostras.....	53
3.2.4	PCR dos genes ICP4 e TK.....	53
3.2.5	Sequenciamento de DNA.....	54
3.2.6	Edição e análise das sequências.....	55
3.3	RESULTADOS.....	55
3.3.1	Triagem das amostras.....	55
3.3.2	PCR dos genes ICP4 e TK.....	55
3.3.3	Sequenciamento de DNA do gene ICP4.....	56
3.3.4	Sequenciamento de DNA do gene TK.....	59
3.4	DISCUSSÃO.....	63
3.5	CONCLUSÃO.....	65
	REFERÊNCIAS.....	66
4	DESENVOLVIMENTO DE UMA REAÇÃO EM TEMPO REAL PARA A DETECÇÃO DO VÍRUS DA LARINGOTRAQUEÍTE INFECCIOSA	

	(VLTl).....	71
4.1	INTRODUÇÃO.....	71
4.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	72
4.2.1	Amostras virais.....	72
4.2.2	Suspensão viral.....	77
4.2.3	Extração do DNA viral das amostras.....	78
4.2.4	PCR e <i>Nested</i> PCR para a detecção do VLTl.....	78
4.2.5	Desenvolvimento de uma reação de PCR em Tempo real (qPCR) para a detecção e quantificação de um fragmento do gene que codifica a glicoproteína E (gE) do VLTl.....	79
4.2.6	Técnica da Reação em Cadeia pela Polimerase em tempo real (qPCR).....	80
4.2.7	Determinação da sensibilidade e da curva padrão do qPCR.....	80
4.3	RESULTADOS.....	81
4.3.1	Caracterização molecular (PCR convencional)	81
4.3.2	Desenvolvimento de uma reação de PCR em Tempo real (qPCR) para a detecção e quantificação de um fragmento do gene que codifica a glicoproteína E (gE) do VLTl.....	81
4.4	DISCUSSÃO.....	89
4.5	CONCLUSÃO.....	91
	REFERÊNCIAS.....	92
5	ISOLAMENTO EM OVOS EMBRIONADOS DO VÍRUS DA LARINGOTRAQUEÍTE INFECCIOSA E A PADRONIZAÇÃO DE UM PCR EM TEMPO REAL PARA A DETECÇÃO DESTE VÍRUS PELO GENE ICP4	

		95
5.1	INTRODUÇÃO.....	95
5.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	96
5.2.1	Amostras virais.....	96
5.2.2	Suspensão viral.....	100
5.2.3	Isolamento em ovos embrionados.....	100
5.2.4	Extração do DNA viral das amostras.....	101
5.2.5	Padronização de uma reação de PCR em Tempo real (qPCR) para a detecção e quantificação do gene ICP4 do VLTI.....	101
5.2.6	Técnica da Reação em Cadeia pela Polimerase em tempo real (qPCR) para o gene ICP4.....	103
5.2.7	Determinação da sensibilidade e da curva padrão do qPCR do Gene ICP4.....	103
5.3	RESULTADOS.....	104
5.3.1	Isolamento em ovos embrionados.....	104
5.3.2	Reação de PCR em Tempo real (qPCR) para a detecção e quantificação do gene ICP4 do VLTI.....	106
5.3.3	Detecção e quantificação do VLTI.....	107
5.4	DISCUSSÃO.....	109
5.5	CONCLUSÃO.....	110
	REFERÊNCIAS.....	112

1 INTRODUÇÃO GERAL

A laringotraqueíte infecciosa aviária (LTI) é uma doença respiratória altamente contagiosa, que acomete principalmente galinhas, mas outras aves podem ser afetadas. Anteriormente era conhecida como “difteria aviária”, é causada por um herpesvírus, cujo material genético é o DNA. É um vírus esférico, envelopado e sensível ao éter, sendo capaz de permanecer latente por toda a vida nas aves portadoras.

É uma doença de declaração obrigatória segundo a OIE (Organização Mundial de Sanidade Animal), portanto deve ser obrigatoriamente notificado ao Serviço Oficial Brasileiro.

É uma doença com distribuição mundial e de ocorrência clínica em áreas endêmicas, principalmente em áreas de alta densidade de produção. O vírus infecta preferencialmente galinhas, faisões e perdiz, sendo as galinhas o hospedeiro primário.

Outras aves como, os pavões e canários podem ser acometidos, mas com menor incidência. No entanto, a maior susceptibilidade foi observada em matrizes pesadas e os machos parecem ser mais susceptíveis que as fêmeas. Embora não esteja esclarecida a susceptibilidade ligada à idade, à linhagem genética ou ao sexo, os sinais clínicos foram observados, principalmente, em aves adultas.

A proteína reguladora de transcrição, também conhecida como proteína da célula infectada 4 (ICP4) é produzida antes do início do ciclo de replicação. Ela é responsável pela regulação da expressão tanto dos genes precoces como dos tardios na infecção dos herpesvírus.

O controle da doença é dificultado pelas características do agente etiológico e pelas limitações dos produtos imunológicos utilizados para erradicar a LTI das granjas e eliminar o vírus das aves infectadas. Assim, os vírus de campo e as cepas vacinais apresentam características que dificultam sua eliminação, como por exemplo, a capacidade de estabelecerem infecções latentes, habilidade de disseminação a partir de aves vacinadas para aves não vacinadas e a reversão da virulência.

O diagnóstico da LTI requer assistência laboratorial, pois outros patógenos respiratórios podem causar sinais clínicos e lesões similares. As técnicas que podem ser utilizadas para o diagnóstico da enfermidade são: histopatologia, imunofluorescência, imunohistoquímica, PCR-RFLP, PCR convencional, PCR em Tempo Real e o isolamento viral em cultura celular ou após a inoculação na membrana corio-alantóide de ovos embrionados.

2 EPIDEMIOLOGIA DA LARINGOTRAQUEÍTE INFECCIOSA AVIÁRIA COM ESPECIAL ENFOQUE NA AMÉRICA DO SUL: UMA ATUALIZAÇÃO

2.1 INTRODUÇÃO

A LTI é uma doença altamente contagiosa cujo hospedeiro primário são as galinhas (BAGUST et al., 1986), mas pode afetar os faisões. Estorninhos, pardais, corvos, pombos e patos apresentaram resistência ao vírus (GUY; GARCIA, 2008). O agente causador é um vírus classificado com um *Gallid herpesvirus 1* (King et al., 2012). Causa lesões graves no trato respiratório e severas perdas econômicas devido a mortalidade, diminuição da produção de ovos, perda de peso e a susceptibilidade a outros patógenos aviários (GUY; GARCIA, 2008).

A forma severa causa dificuldade respiratória, expectoração sanguinolenta, espirros e elevada mortalidade. A forma leve é caracterizada por uma traqueíte mucoide, sinusite e baixa mortalidade (OU; GIAMBRONE, 2012).

A doença foi descrita por primeira vez em 1925 (MAY; TITSLER, 1925) e tem sido diagnosticada em vários países, nos quais continua sendo uma doença endêmica, especialmente, em áreas com produção intensiva, com grande concentração de granjas e de múltiplas idades como na América do Norte, na China, na Europa, na Austrália, na África, no Sudoeste da Ásia, na Nova Zelândia, na Austrália, na Polônia, na América do Sul e no Brasil (HIDALGO, 2003; CHACÓN; FERREIRA, 2009).

A transmissão viral ocorre de forma horizontal, os sítios primários de replicação são a mucosa traqueal e a conjuntiva, onde causa inflamação, com secreção tanto serosa como mucoide, e dispneia (COPPO, et al., 2013). O vírus pode invadir o nervo trigêmeo durante a fase lítica da infecção, resultando numa infecção latente que pode permanecer durante toda a vida do animal e alguns fatores estressantes como o alojamento de outras aves e o início da postura pode causar a reativação, replicação e a eliminação do vírus (HUGHES et al., 1989; HUGHES et al., 1991; WILLIAMS et al., 1992; COPPO, et al., 2013). Estudos experimentais mostraram que o vírus pode ser detectado em outros órgãos como o coração, o fígado, o baço, o pulmão, o rim, a língua, o timo, o proventrículo, o pâncreas, o duodeno, o jejuno, o

íleo, o ceco, as tonsilas cecais, a bursa de Fabricius e o cérebro (OLDONI et al., 2009; ZHAO et al., 2013; WANG et al., 2013; PARRA et al., 2015a).

Como o vírus da LTI apresenta grande importância para a sanidade aviária, se faz necessário que o conhecimento sobre esta doença respiratória esteja sempre atualizado. Na revisão a seguir as características do vírus, a patologia, a imunologia, o diagnóstico, a descrição da doença e as estratégias de controle, com enfoque na América do Sul, foram abordados.

2.2 DESCRIÇÃO DO AGENTE E DA DOENÇA

2.2.1 Etiologia

O vírus da LTI pertence à família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae*, gênero *Iltovirus* e foi classificado taxonomicamente como um *Gallid herpesvirus tipo 1*. Esta subfamília inclui alguns patógenos importantes tanto para animais quanto para humanos, ou seja, o herpesvírus humano 1 (*Simplex* vírus), o vírus da peste suína, o vírus da varicela zoster (vírus da varicela) e o causador da doença de Marek (JOHNSON; YACK, 1995).

É um vírus DNA de forma icosaédrica, com um diâmetro de 195-250 nm, densidade de 1,704 g/mL. O genoma consiste numa molécula de cadeia dupla linear de 155 Kb, que possui uma região única longa (UL) e uma região única curta (US) flanqueada por repetições invertidas (JOHNSON et al., 1991; BAGUST et al., 2000).

2.2.2 Susceptibilidade a agentes físicos e químicos

O vírus da LTI mostra sensibilidade aos agentes lipolíticos como o éter e o clorofórmio, porém pode sobreviver durante vários meses armazenado em diluentes adequados, tais como, glicerol a 50% e leite desnatado estéril (BAGUST et al., 2000). Também tem a capacidade de sobreviver no exsudado traqueal e nas

carcaças por um período de 10-100 dias em temperatura de 13-23°C (JORDAN, 1966).

Os desinfetantes químicos como os derivados do alcatrão de carvão, o formaldeído, o hipoclorito e os iodoforos podem inativar eficazmente o vírus (GUY; GARCIA, 2008). As soluções de cresol 3% ou de soda caustica 5% podem inativar o vírus em menos de um minuto e o uso de peróxido de hidrogênio 5% foi eficaz na desinfecção de equipamentos (NEIGHBOUR et al., 1994). O uso de desinfetantes comerciais que reduzem a formação de biofilme foram eficientes na eliminação de vírus provenientes de vacinas das linhas de água e *nipples* depois da vacinação do lote, por via água de bebida (OU et al., 2011).

2.2.3 Sistemas de laboratório hospedeiros

A propagação do vírus da LTI pode ser realizada em ovos embrionados de galinha, com 9 a 11 dias de incubação. O vírus pode induzir a formação de placas opacas na membrana corio-alantoide (MCA), após 48 h da infecção e a morte embrionária entre 2 a 8 dias pós infecção (PI). O vírus também foi propagado em uma variedade de cultura de células aviárias como as derivadas de fígado de embrião de galinha (CEL), de rim de embrião de galinha (CEK) e de células de rim de galinha (CK), existindo arredondamento dos nucléolos, deslocamento da cromatina, aumento da refractariedade e aumento do tamanho das células. Existe também a formação de sincícios que é o resultado da fusão citoplasmática (HUGHES; JONES, 1988; GARCIA et al., 2014).

Células derivadas de fígado de embrião de galinha foram as mais sensíveis para o isolamento primário do vírus a partir de material clínico (GARCIA et al., 2014); células de fibroblastos de embrião de galinha, células VERO e células de codorniz apresentaram pouca sensibilidade para o crescimento do vírus a partir de material de campo (SCHNITZLEIN et al., 1994; GARCIA et al., 2014). Além disso, o vírus pode ser propagado em células LMH (*leghorn male hepatoma*), uma linhagem celular derivada de tumor de fígado de galinha induzido quimicamente e que foram utilizadas para a investigação das interações vírus - hospedeiro (SCHNITZLEIN et al., 1994).

2.2.4 Hospedeiros

As aves de todas as idades se mostraram susceptíveis a infecção pelo o vírus da LTI, mas animais de mais de três semanas de idade foram os mais sensíveis (OU; GIAMBRONE, 2012). O vírus pode infectar também faisões, cruzamento de faisões-galinha, pavões, perus jovens (CRAWSHAW; BOYCOTT, 1982; PORTZ et al., 2008). Estorninhos, pardais, corvos, pombos, patos parecem ser refratários ao vírus (GUY; GARCIA, 2008). Além disso, o vírus da LTI foi isolado de uma galinha d'Angola proveniente de uma granja com histórico de doença respiratória (BAUTISTA, 2003). Não foi demonstrada infecção subclínica e soro conversão em patos (YAMADA et al., 1980).

2.2.5 Transmissão

A transmissão do vírus da LTI ocorre naturalmente através do trato respiratório superior e pela via ocular. A ingestão também pode ser uma forma de infecção, embora seja necessária a exposição do epitélio nasal após a ingestão do vírus (ROBERTSON; EGERTON, 1981). As principais fontes de transmissão foram as galinhas clinicamente infectadas, animais com infecção latente, poeira contaminada, besouros, água de bebida e fômites (OU et al., 2011). Estudos mostraram que o vírus pode permanecer no biofilme da água e, subsequentemente, pode ser transmitido para aves sensíveis (OU; GIAMBRONE, 2012). Outras possíveis fontes de transmissão podem ser cães, gatos e corvos (KINGSBURRY; JUNGHER, 1958). A transmissão do vírus por via aérea entre as granjas é também uma forma de propagação importante do vírus (JOHNSON et al., 2005).

2.2.6 Infecção aguda e latente

O órgão-alvo para a infecção e desenvolvimento da doença é o epitélio respiratório, sendo o epitélio da traqueia e da laringe os mais afetados. No entanto, os sacos aéreos, os pulmões e as membranas mucosas, como a conjuntiva e os seios nasais, podem ser infectados periodicamente. Se as aves são expostas ao vírus por via oral, por via nasal, pela conjuntiva ou por inoculação experimental, a replicação viral ocorre no epitélio traqueal apenas durante a primeira semana da infecção, baixas concentrações do vírus podem ser detectadas esporadicamente dez dias pós infecção (p.i.) (BAGUST, 1986; WILLIAMS et al., 1992).

No período de aproximadamente dez dias até quatro semanas após a infecção da traqueia a disseminação do vírus não mais ocorre, porém, uma infecção latente é estabelecida através da invasão dos tecidos nervosos. O vírus invade o gânglio trigêmeo, entre três a seis dias da fase aguda da infecção, seja por cepas de campo ou vacinais (BAGUST, 1986).

A forma exata de infecção do gânglio trigêmeo é desconhecida, mas este nervo fornece inervação sensorial para os tecidos do trato respiratório superior, para a língua, para os olhos, a parte distal do nervo também está envolvida na inervação da traqueia (BAGUST, 1986; WILLIAMS et al., 1992; BAGUST; JOHNSON, 1995). Estudos utilizando PCR indicaram que o gânglio trigêmeo é o principal órgão de latência do vírus (WILLIAMS et al., 1992).

Depois de quinze meses após a vacinação, o vírus pode ser reativado a partir do nervo trigêmeo e o DNA viral pode ser detectado dois dias após as aves serem vacinadas por via ocular (WILLIAMS et al., 1992; RODRIGUEZ-AVILA et al., 2007). A excreção do vírus pode aumentar consideravelmente quando as aves são submetidas a estresse como no início da postura ou quando são alojadas com aves desconhecidas, neste caso, as aves com infecção latente podem causar infecção em animais susceptíveis (HUGHES et al., 1991; WILLIAMS et al., 1992).

2.2.7 Sinais clínicos

A doença apresenta-se de duas formas: severa e moderada. Na forma severa os principais sinais clínicos foram a dispneia, a presença de muco sanguinolento, a conjuntivite com comprometimento moderado a severo, pode causar morbidade elevada (90-100%) e uma mortalidade superior a 70%, mas geralmente ocorre entre 10% - 20% das aves. Além disso, inflamação e necrose, com hemorragia foram observados na mucosa e no trato respiratório (BAGUST et al., 2000; GARCIA et al., 2014).

Na forma moderada os sinais observados foram a depressão, a diminuição da produção de ovos, a inflamação dos seios infraorbitários (olhos de amêndoa), uma traqueíte leve, mucoide, a presença de estertores respiratórios, uma conjuntivite hemorrágica leve e um corrimento nasal persistente (RAGGI et al., 1961; OU et al., 2012). A recuperação dos animais pode ocorrer em 10-14 dias, mas dependendo da cepa os sinais clínicos podem se estender por algumas semanas (GUY; GARCIA, 2008; OU et al., 2012; GARCIA et al., 2014). Os sinais clínicos aparecem após 6-12 dias à exposição natural, no entanto, em infecções experimentais o período de incubação é menor, de 4-7 dias p.i. (GARCIA et al., 2014).

2.2.8 Lesões

As lesões macroscópicas podem ser observadas na conjuntiva e em todo o trato respiratório das aves infectadas, porém foram mais observadas na laringe e na traqueia. Na forma severa, na traqueia, nas fases iniciais são observadas uma inflamação mucoide e hemorragia; enquanto degeneração e necrose são encontrados nas fases posteriores; a inflamação pode estender-se até os brônquios, os pulmões e os sacos aéreos. (GARCIA et al., 2014). Na forma moderada pode se observar na traqueia uma inflamação mucoide moderada, com diferentes graus de hemorragia, localizada na laringe e traqueia superior (SELLERS et al., 2004).

As lesões microscópicas variam de acordo com o estágio da doença. Nos primeiros dias pode se observar as células caliciformes e um infiltrado de células inflamatórias na mucosa. Com o progresso da infecção, a conjuntiva e as células epiteliais respiratórias aumentam de tamanho, tornando-se edematosas; formam-se sincícios pela fusão de células, originando as células multinucleadas, os histiócitos e as células plasmáticas migram para dentro da mucosa e submucosa (GARCIA et al., 2014).

Na fase inicial da infecção, na traqueia e células epiteliais da conjuntiva são encontrados corpúsculos de inclusão intranucleares, mas ocorrem apenas por alguns dias (1-5 dias), e depois desaparecem devido à necrose e a descamação do epitélio (GUY et al., 1992).

2.2.9 Resposta imune

A infecção pelo vírus da LTI pode estimular diferentes respostas imunes (GARCIA et al., 2014), no entanto, a imunidade humoral não é a principal resposta contra o vírus (OU; GIAMBRONE, 2012). Usando o método de neutralização viral se observou que o vírus era detectado 5-7 dias após a infecção, sendo que as maiores concentrações de anticorpos específicos circulantes foram encontradas aos 21 dias após a infecção e concentrações menores após meses da infecção (JORDAN, 1981), mas estes anticorpos podem persistir por um ano ou mais (BAGUST de 1986). Os anticorpos já podem ser detectados nas secreções da traqueia após 7 dias da infecção, sendo que concentrações máximas são observadas após 10-28 dias da infecção (GARCIA et al., 2014).

A resposta imune mediada por células é considerada de grande importância para a resistência contra o vírus da LTI (COPPO, M. J. C.; HARTLEY, C. A.; DEVLIN, J. M., 2013). Experimentos mostraram que as aves que tinham a resposta imune humoral bloqueada pela retirada da Bursa de Fabricius ou tratados com ciclofosfamida em capazes de desenvolver uma resposta mediada por células (YORK; FAHEY, 1990).

Estudos sugerem que o gene da glicoproteína G (gG) presente no genoma do vírus da LTI, codifica uma proteína que se liga a quimiocina de largo espectro viral

(vCKBP); esta proteína tem características semelhantes a alguns poxvírus e também com o herpesvírus murino gama 68 (MHV-68), cuja função é evadir da resposta imune do hospedeiro (COPPO, M. J. C.; HARTLEY, C. A.; DEVLIN, J. M., 2013).

Os anticorpos maternos são transmitidos para a descendência através de ovos (BENTON et al., 1960). No entanto, os anticorpos maternos não conferem proteção contra a infecção, nem interferem com a vacinação (FAHEY et al., 1983). Estudos demonstraram que a transferência dos anticorpos maternos para a progênie ocorre no primeiro dia de idade (GHARAIBEH et al., 2008).

2.2.10 Vacinação

A vacinação é a melhor maneira de prevenir a infecção, mas determinadas vacinas podem induzir ao estado de portadores latentes. Estes portadores latentes podem ser a fonte de disseminação do vírus em lotes não vacinados (ANDREASEN et al., 1989). Altos índices de proteção ocorrem entre quinze e vinte semanas após a vacinação com graus variáveis de proteção das aves ao longo do ano (YORK et al., 1989; FAHEY; YORK, 1990). As cepas vacinais mais utilizadas foram as de vírus vivo modificado, produzidas em ovos embrionados (CEO – *chicken embryo origin*) ou em cultura celular (TCO – *tissue culture origin*). Comparando a proteção fornecida pelas vacinas CEO e TCO, não houve diferença significativa na imunidade das aves depois de 10 semanas da vacinação. No entanto, em aves com mais de 20 semanas da vacinação, a vacina CEO proporcionou uma melhor proteção do que a vacina TCO (ANDREASEN et al., 1989).

Os principais métodos para a administração de vacinas vivas são o aerossol ocular e a água de bebida. A aplicação na água de bebida apresenta dificuldades como a qualidade da água que varia entre as granjas, as aves podem não receber a quantidade necessária do vírus e não desenvolver a proteção necessária. Para que a vacinação por esta via tenha sucesso é necessário que o vírus vacinal entre em contato com as células do epitélio nasal (ROBERTSON; GERTON, 1981), porém aplicações da vacina por aerossol podem gerar reações pós vacinais severas (CLARKE et al., 1980). Alguns estudos indicaram que as vacinas vivas modificadas aumentavam a virulência do vírus ao passar de ave para ave, e após a sexta

passagem poderia produzir sinais clínicos graves em aves desafiadas. As vacinas produzidas em ovos embrionados (CEO) têm uma maior tendência de aumentar a virulência do vírus depois de passagens sucessivas nas aves, em relação às vacinas produzidas em cultura de células (TCO) (GUY et al., 1991; KOTIW et al., 1995). Estudos epidemiológicos indicaram que surtos ao redor do mundo estavam relacionados principalmente ao uso de vacinas vivas atenuadas (MENENDEZ et al., 2014).

Com os avanços tecnológicos na área de biologia molecular, vacinas recombinantes foram colocadas no mercado, essas vacinas são produzidas pela inserção de glicoproteínas do vírus da LTI em vetores virais, tais como: o poxvírus (FPV) (DAVISON et al., 2006), o herpes vírus de peru (HVT) (VAGNOZZI et al., 2012) ou o vírus da boubá aviária (TONG et al., 2011). A vacina recombinante do vírus da boubá aviária contendo o gene que codifica a glicoproteína B (gB) do VLTI estimulou a proteção contra cepas virulentas (TONG et al., 2011). Outra vacina recombinante de boubá aviária, que contém os genes para a glicoproteína B (gB) e UL32 foi eficaz na proteção das aves ao desafio com uma cepa virulenta aplicada na asa (COPPO et al., 2013).

Uma vantagem destas vacinas recombinantes é que não causam infecção latente ou reversão da virulência. Apesar de serem mais seguras do que as vacinas vivas atenuadas, o alto custo e o fato de serem injetadas têm limitado a sua utilização (OU; GIAMBRONE, 2012).

Alguns vírus da LTI com genes deletados foram capazes de manter a capacidade de produzir resposta imune, sem produzir sinais clínicos ou latência. Foram realizados estudos para o desenvolvimento de uma nova vacina mediante a deleção de genes. Entre os genes que foram suprimidos estão aqueles que codificam a glicoproteína C (gC) (PAVLOVA et al., 2010), a glicoproteína G (gG) (DEVLIN et al., 2006), a glicoproteína J (gJ) (FUCHS et al., 2005), a timidina quinase (TK) (HAN et al., 2002), da proteína UL0 (UL - região única longa) (VEITS et al., 2003), e UL47 (HELFERICH et al., 2007). Estes estudos demonstraram a atenuação do vírus e que poderiam ser utilizados para a produção de vacina. Outra vacina contra a LTI foi desenvolvida utilizando o gene gB combinado com o gene da interleucina IL-18 em um vector bicistrônico, e induziu uma melhor proteção em aves desafiadas com LTI do que aquelas que continham apenas o gene de gB (CHEN et al., 2010).

A vacina deficiente da gG que foi administrada em aves SPF com três semanas de idade, por meio de água de bebida ou gota no olho induziu uma imunidade adequada contra o desafio e poderia ser usada para vacinar galinhas em larga escala, porém, mais estudos são necessários para a sua utilização em lotes comerciais de aves (DEVLIN et al., 2008).

Existem também vacinas que utilizaram o vírus da LTI como vector recombinante, a fim de conter genes que codificavam proteínas altamente patogênicas do vírus da influenza aviária (H5 e H7) e estas vacinas poderiam proteger as aves tanto para a LTI quanto para a influenza aviária (PAVLOVA et al., 2009). Uma vacina recombinante com o vírus da LTI, onde o gene HPAI H5 do vírus da influenza aviária foi inserido na região deletada do gene UL50 do vírus da LTI, protegeu as aves do desafio tanto com o vírus homólogo como com o vírus heterólogo H5N1 e H5N2 (PAVLOVA et al., 2009).

2.2.11 Diagnóstico

O diagnóstico laboratorial é necessário para a identificação do vírus da LTI, pois existem outras doenças que apresentam sinais clínicos e lesões muito semelhantes, como: a influenza aviária, a bronquite infecciosa das galinhas, a doença de Newcastle, a coriza infecciosa, a micoplasmose aviária. Apenas em casos de doença aguda grave, com alta mortalidade e expectoração de sangue, o diagnóstico pode ser realizado com base nos sinais clínicos (GUY; GARCIA, 2008).

2.2.12 Histopatologia

A Laringotraqueíte infecciosa aviária é caracterizada pelo desenvolvimento de corpos de inclusão intranucleares eosinofílicos nas células epiteliais da conjuntiva e do trato respiratório. Estes corpos de inclusão podem ser detectados nos tecidos por coloração com Giemsa ou com hematoxilina e eosina, após o processamento histológico (GUY; GARCIA, 2008). A hiperplasia epitelial leva a formação de células

multinucleadas (sincícios) onde os corpos de inclusão intranucleares podem ser evidentes. O edema é observado após ocorrer hemorragia na lâmina própria com a descamação epitelial e a perda de glândulas mucosas. A regeneração começa depois de aproximadamente seis dias, período após o qual os corpúsculos de inclusão intranucleares não são mais visíveis (BAGUST et al., 2000).

Métodos rápidos para o processamento de tecidos foram descritos e estes envolveram a rápida desidratação dos tecidos para permitir o exame após três horas de processamento (PIROZOK et al., 1957; SEVOIAN, 1960). Embora o diagnóstico histopatológico, por detecção de corpos de inclusão intranucleares seja altamente específico, o isolamento do vírus é mais sensível (GUY et al., 1992).

2.2.13 Isolamento viral

O isolamento viral pode ser realizado pela inoculação de amostras clínicas de tecido ou exsudado de traqueia, da laringe, do pulmão, da conjuntiva ou de suabe de traqueia na MCA de ovos embrionados com 9 a 12 dias de idade (esta é a via mais sensível de inoculação) (HICHTNER et al., 1958), nesta há a produção de placas com bordas opacas e uma área central deprimida de necrose (GARCIA et al., 2014). Além disso, o isolamento pode ser realizado em cultura de células como CEL e CK. Na cultura celular pode ser observada a formação de células gigantes multinucleadas 24 horas p.i. Em ambos os casos, é necessário mais de uma passagem para o isolamento do vírus (BAGUST et al., 2000).

Após o aparecimento de sinais clínicos nas aves, as amostras devem ser coletadas o mais rapidamente possível, porque as tentativas de isolamento podem não ser bem-sucedidas depois de 6-7 dias após a infecção (GUY et al., 1992).

2.2.14 Detecção do vírus através de outras técnicas

Os métodos para a detecção viral incluem imunofluorescência (IF), imunoperoxidase (IP), neutralização viral (VN), ensaio imunoenzimático (ELISA), técnicas de hibridação de DNA, microscopia eletrônica de coloração negativa (ME), e reação em cadeia pela polimerase (PCR) (BAGUST et al., 2000). A IF ou IP são realizadas com seções ou raspagem do epitélio das aves afetadas. As proteínas virais foram detectadas por IF por até catorze dias após a exposição (WILKS; KOGAN, 1979). GUY, et al. (1992) encontraram por IF o antígeno do vírus da LTI em tecidos traqueais do dia 1 ao dia 9 p.i. e demonstraram que a IP é mais sensível do que a IF. Estudo com ELISA utilizando anticorpos monoclonais para o vírus da LTI, mostrou que os resultados eram tão confiáveis quanto o isolamento viral, eram mais rápido e mais preciso do que a IF ou a imunodifusão em ágar na detecção do vírus da LTI (JORDAN; CHUBB, 1962). A utilização de microscopia eletrônica coloração negativa foi um dos métodos para se detectar o vírus da LTI, mas não foi muito sensível e devem existir títulos virais de $3,0 \log_{10}$ por grama, para que as partículas virais possam ser identificadas (BAGUST et al., 2000). Existem alguns métodos para a detecção de DNA viral que podem identificar o vírus mais rapidamente, com mais precisão, e são altamente sensíveis. As técnicas moleculares incluem os ensaios de hibridação *dot-blot*, a clonagem do DNA viral, que são muito sensíveis para a detecção viral quando o isolamento viral e o ELISA foram negativos (KEAM et al., 1991; KEY et al., 1994). Há também outros métodos como a PCR, *Nested* PCR, PCR em tempo real, PCR multiplex, hibridização *in situ* (NAGY, 1992; NIELSEN et al., 1998, CHACON; FERRERIRA, 2008) e PCR seguido de RFLP (CHANG et al., 1997; KIRKPATRICK et al., 2006; CHACON et al., 2010; PARRA et al., 2015b). A detecção por PCR do vírus da LTI foi mais sensível do que o isolamento do vírus ou a microscopia eletrônica e também permitiu a detecção de vírus em amostras que continham outros agentes virais (WILLIAMS et al., 1994).

Comparando a detecção viral por PCR em tempo real para o diagnóstico em surtos, este foi o método mais sensível em comparação com a histologia, microscopia eletrônica, isolamento em ovos embrionados e IF. Porém, porque muitos laboratórios não têm o PCR em tempo real como método diagnóstico, os métodos empregados comumente na rotina de diagnóstico são a histopatologia, a IF

e o PCR em ponto final ou convencional (CRESPO et al., 2007). Um novo método de amplificação de DNA isotérmica, denominada *loop mediated isothermal amplification* (LAMP), onde a amplificação ocorre em uma temperatura constante, foi comparada com a PCR em tempo real; e ambos métodos foram altamente específicos e sensíveis. O LAMP é adequado para o diagnóstico laboratorial e o PCR em tempo real poderia ser utilizado para a confirmação de resultados (OU et al., 2012).

2.2.15 Diagnóstico diferencial

A LTI deve ser diferenciada de outros patógenos associados a doenças respiratórias, tais como, a boubá aviária, a doença de Newcastle, a influenza aviária, a bronquite infecciosa, o adenovírus de galinha e a aspergilose (GARCIA et al., 2014).

2.2.16 Prevenção

É muito importante para a prevenção evitar o contato entre aves não vacinadas com aves vacinadas ou que estejam se recuperando após um surto, sendo necessárias boas práticas de manejo e biossegurança. Biossegurança inclui protocolos e procedimentos para prevenir a infecção e a transmissão de agentes patogênicos tanto para as aves como para os seres humanos, os insetos, as aves selvagens ou outros animais (KINGBURRY et al., 1958; OU et al., 2012.). Como forma de controlar os surtos, sistemas de informação geográfica com informações de uma região foram fundamentais para se fazer planos de biossegurança, quarentena, vacinação e diagnóstico precoce. A vacinação adequada e a cooperação entre governo e indústria foram muito importantes para o controle da LTI (DUFOR-ZAVALA, 2008; CHIN et al., 2009).

2.2.17 Tratamento

Nenhuma droga mostrou eficácia na redução da severidade das lesões ou do alívio dos sintomas da doença; os antibióticos não têm efeito contra o vírus, mas pode controlar a instalação de uma possível infecção bacteriana secundária (GUY; GARCIA, 2008). No entanto, se existe um diagnóstico rápido em um surto pode-se vacinar as aves não afetadas e induzir a proteção antes de sua exposição (GARCIA et al., 2014).

2.3 LTI SITUAÇÃO NA AMÉRICA DO SUL

2.3.1 Brasil

No Brasil, em 1974, o vírus da LTI foi isolado e identificado em aves com sinais respiratórios, traqueíte hemorrágica grave e mortalidade na cidade de Petrópolis, Estado do Rio de Janeiro (HIPÓLITO et al., 1974). Em 1980, foi novamente isolado no Estado do Rio de Janeiro e caracterizado como um vírus de baixa patogenicidade em frangos de corte (SOARES et al., 1980). A primeira epidemia foi em galinhas poedeiras de 10 meses de idade que tiveram uma queda na produção, mortalidade e foi reportada entre os anos de 1981 e 1982 no Estado do Rio de Janeiro (ARAUJO et al., 1982). Em 1995, Vargas detectou anticorpos contra o vírus da LTI em fazendas no Estado do Rio Grande do Sul.

No final de 2002, foram notificados surtos suspeitos de LTI em poedeiras comerciais na região das cidades de Bastos e Tupã, no Estado de São Paulo (ITO et al., 2003). O vírus foi isolado em ovos embrionados pelo laboratório Lanagro-SP, detectado por PCR e submetido a caracterização molecular pela Universidade de São Paulo (USP) (CHACON et al., 2007; CHACON; FERREIRA, 2008; CHACON; FERREIRA, 2009). Como medida de controle para evitar a propagação da doença, a quarentena foi realizada pelos avicultores sob a coordenação das autoridades de saúde e também começou a vacinação com vacinas vivas originadas de embrião de

galinhas (CEO) e com a vacina produzida em células (TCO). Estas vacinas só eram comercializadas com autorização e o procedimento de vacinação era acompanhado por técnicos credenciados do Ministério da Agricultura do Brasil.

A doença teve grande impacto na região, causando a morte de mais de 1.000.000 de aves (CHACON, 2008). A epidemia afetou todas as granjas da região com diferentes intensidades, possivelmente, devido aos diferentes níveis de biossegurança destas. As mais afetadas foram as granjas de pequeno porte e as aves de quintal (CHACON et al., 2007; CHACON et al., 2015).

A técnica de RFLP-PCR e análise de sequências do gene ICP4 de isolados de campo do surto clínico de 2002-2003, de Bastos, mostrou que o surto foi causado por uma cepa não vacinal de alta virulência e que esta cepa continua circulando na região de Bastos, apesar do programa de vacinação realizado (CHACON et al., 2010; PARRA et al., 2015b).

Em 2012, uma nova vacina vetorizada contra a LTI foi desenvolvida pela CEVA Saúde Animal (FP Vectormune LT) e apresentada aos criadores de aves na região de Bastos (<http://www.portalsuinoeaves.com.br/ceva-lanca-nova-Vacina-contra-laringotraqueíte-em-aves/>). Esta vacina usa como vetor o vírus da boubá aviária geneticamente modificado, para expressar antígenos protetores contra o vírus da LTI. (<http://www.ceva.com.br/Especies-Produtos/Lista-de-Produtos/VECTORMUNE-FP-LT>). Outra vacina disponível para a comercialização no Brasil é a LTI vetorizada no herpesvírus de perus que foi associado à vacina de Marek, este vetor codifica a glicoproteína I (gI) e gD (Innovax®-ILT; Intervet International BV, Whitehouse Station, NJ, EUA) (COUTO, 2014).

Em Minas Gerais, ocorreu um surto em 2010, em granjas de aves de múltiplas idades (PREIS et al., 2013) e foi causado por uma cepa não vacinal de baixa virulência e a agência agrícola governamental autorizou apenas a utilização de vacinas vetorizadas nesta região, para a prevenção de novos casos (COUTO et al., 2014). Estudos recentes mostraram que tanto a vacina CEO como a vacina TCO ainda estão em circulação nos lotes de galinhas em diferentes regiões do Brasil (CHACON et al., 2015; PARRA et al., 2015b).

2.3.2 Argentina

Na Argentina, os surtos ocorrem periodicamente, especialmente, em áreas com alta densidade de granjas, com manejo e biossegurança inadequados, granjas onde existem uma dupla produção (criação e postura) e em alguns casos aves de quintal. Geralmente, estes surtos ocorrem devido à passagem do vírus de aves infectadas, pela exposição ao vírus de campo ou de aves vacinadas com vacinas preparadas em embrião de galinha (CEO).

A utilização e comercialização de vacinas é feita através da Direção de Fornecimento de Produtos Químicos Agrícolas e Veterinários SENASA No. 1559/2007 (BACK; LEÃO, 2003).

2.3.3 Peru

A LTI no Peru foi relatada pela primeira vez em agosto de 2008 (LEISEQUIA, 2013) e se caracterizou por uma elevada morbidade e mortalidade. Ocorreu em granjas avícolas no Departamento de Lima e mais tarde foi descrita nos Departamentos de Arequipa, Ancash, Ica, La Libertad e Tacna (OIE Wahid interface, 2010). As principais lesões encontradas em galinhas poedeiras e galos de briga foram: inflamação dos seios nasais e paranasais, inflamação das pálpebras e conjuntivite, presença de material caseoso no palato, placas diftéricas no esôfago e laringe, conteúdo hemorrágico e coágulos de sangue na traqueia. Em frangos de corte, foram encontrados inflamação das pálpebras, conjuntivite e presença de sangue na traqueia. Diferentes programas de vacinação com uma vacina vetorizada foram utilizados em diferentes granjas e houve um claro impacto positivo e benéfico no controle da doença (dados não publicados)¹.

¹ NEGRETE, M. C. **Laringotraqueitis infecciosas**: la experiencia Peruana. Perú: CEVA Salud Animal. Disponível em: <http://amevea-ecuador.org/web_antigua/datos/LARINGOTRAQUEITIS%20INFECCIOSA%20LA%20EXPERIENCIA%20PERUANA.pdf>. Acesso em> 12 abr. 2016.

2.3.4 Equador

Na primeira metade do ano 2012 foi relatado pela primeira vez o aparecimento de LTI em granjas avícolas no país. O vírus da LTI foi detectado por PCR nas cidades de La Concordia, Píllaro e Salcedo, a fonte de infecção era desconhecida (dados não publicados). Os resultados da doença e as informações contidas na notificação foram obtidos na Universidade San Francisco de Quito. A duração da investigação foi de março de 2011 a março de 2012, foram coletadas amostras nas províncias de Pichincha, La Concordia, Tungurahua, Cotopaxi, Manabí, Guayas e Chimborazo; ocorrendo resultados positivos no PCR nas amostras das províncias de Cotopaxi, Tungurahua e La Concordia. Os resultados da pesquisa foram entregues ao AGROCALIDAD (*Agencia Aseguradora de la Calidad del Agro*), em maio de 2012 e esta organização corroborou os resultados de colheita de amostras; nesta etapa foram avaliadas a densidade populacional, a história de sintomas respiratórios compatíveis com a doença, idade e tipo de produção (ROJAS, 2014).

2.3.5 Bolívia

As doenças de aves mais comuns nos vales de Cochabamba são micoplasmose, salmonelose e outras de incidência menor, como bronquite infecciosa das galinhas.

No primeiro semestre de 2005 foram registrados quatro casos de Laringotraqueíte (<http://www.midiatecavipec.com/avicultura/avicultura020908.htm>).

Além disso, o vírus de LTI foi relatado em outros países como Uruguai, Colômbia e Chile (BACK; LEÃO, 2003; HIDALGO, 2003).

2.4 CONCLUSÃO

Em vários países da América do Sul ocorreram surtos de LTI, confirmando que a LTI é uma doença de distribuição mundial que provoca grandes perdas econômicas na indústria avícola. Como o vírus causador desta doença faz latência, é importante que boas práticas de manejo e de biossegurança sejam implementadas para sua prevenção e controle. Além do uso de boas práticas de manejo e biossegurança, o emprego de vacinas para estimular a produção de anticorpos específicos que neutralizam o vírus a vigilância da presença de vírus circulantes por testes diagnósticos são fundamentais para o controle rigoroso da doença. Dessa forma, é possível evitar perdas econômicas, e impedir que o vírus se manifeste em todos os países da América do Sul. É importante também manter-se atualizado com as informações sobre sinais clínicos específicos, epidemiologia da doença, doenças associadas e especialmente doenças imunossupressoras.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, L. M. G.; SILVA, R. C. F.; SANTOS, J. A.; BONACCORSI, R. A.; BITTENCOURT, N. R. A.; GOMES, T. A. Estudo sobre um foco de Laringotraqueíte infecciosa das galinhas no município de Petrópolis/RJ; características fundamentais da doença e do vírus. **PESAGRO-RIO**, v. 10, p. 1–4, 1982.
- BACK, A.; LEÃO, J. A. Laringotraqueíte. In: SIMPÓSIO BRASIL SUL DE AVICULTURA, 4., 2003, Chapecó, SC. 2003. p. 50–56.
- BAGUST, T. J. Laryngotracheitis (Gallid-1) herpesvirus infection in the chicken. 4. Latency establishment by wild and vaccine strains of ILT virus. **Avian Pathology**, v. 15, n. 3, p. 581–595, 1986.
- BAGUST, T. J.; CALNEK, B. W.; FAHEY, K. J. Gallid-1 herpesvirus infection in the chicken. 3. Reinvestigation of the pathogenesis of infectious laryngotracheitis in acute and early post-acute respiratory disease. **Avian Diseases**, v. 30, p. 179–190, 1986.
- BAGUST, T. J.; JOHNSON, M. A. Avian infectious laryngotracheitis: Virus-host interactions in relation to prospects for eradication. **Avian Pathology**, v. 24, n. 3, p. 373–391, 1995.
- BAGUST, T. J.; JONES, R. C.; GUY, J. S. Avian infectious laryngotracheitis. **Revue Scientifique et Technique-office International des Epizootiespizooties**, v. 19, n. 2, p. 483–492, 2000.
- BAUTISTA, D. Isolation of Infectious laryngotracheitis vírus (ILTV) from peafowls and chickens with a history of respiratory diseases. In: AVMA ANNUAL CONVENTION, 140., Colorado Springs, CO, USA, 2003. p. 24.
- BAUER, B.; LOHR, J. E.; KALETA, E. F. Comparison of commercial ELISA test kits from Australia and the USA with the serum neutralization test in cell cultures for the detection of antibodies to the infectious laryngotracheitis virus of chickens. **Avian**

Pathology, v. 28, p. 65–72, 1999.

BENTON, W. J.; COVER, M. S.; KRAUSS, W. C. Studies on parental immunity to Infectious Laryngotracheitis of Chickens. **Avian Diseases**, v. 4, p. 491–499, 1960.

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

CHACON, J. L.; BRANDAO, P. E. B.; VILLAREAL, L. Y. B.; GAMA, N. M.; FERREIRA, A. J. P. Survey of Infectious Laryngotracheitis Outbreak in Layer Hens and Differential Diagnosis with other Respiratory Pathogens. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 9, p. 61–67, 2007.

CHACON, J. L.; FERREIRA, A. J. P. Development and validation of nested-PCR for the diagnosis of clinical and subclinical infectious laryngotracheitis. **Journal of Virological Methods**, v. 151, p. 188–93, 2008.

CHACON, J. L.; FERREIRA, A. J. P. Differentiation of field isolates and vaccine strains of infectious laryngotracheitis virus by DNA sequencing. **Vaccine**, v. 27, n. 48, p. 6731–6738, 2009.

CHACON, J. L.; MIZUMA, M. Y.; PIANTINO FERREIRA, A. J. Characterization by restriction fragment length polymorphism and sequence analysis of field and vaccine strains of infectious laryngotracheitis virus involved in severe outbreaks. **Avian Pathology**, v. 39, n. 6, p. 425–433, 2010.

CHACON, J. L.; NARANJO, L. F. N.; VEJARANO, M. P.; PARRA, S. H. S.; ASTOLFI-FERREIRA, C.; FERREIRA, A. J. P. Persistence and spreading of field and vaccine strains of infectious laryngotracheitis virus (ILTIV) in vaccinated and unvaccinated geographic regions, in Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, v. 47, n. 6, p. 1101–1108, 2015.

CHANG, P. C.; LEE, Y. L.; SHIEN, J. H.; SHIEH, H. K. Rapid differentiation of

vaccine strains and field isolates of infectious laryngotracheitis virus by restriction fragment length polymorphism of PCR products. **Journal of Virology Methods**, v. 66, p. 179–186, 1997.

CHEN, H. Y.; ZHAO, L.; WEI, Z. Y.; CUI, B. A.; WANG, Z. Y.; LI, X. S.; XIA, P. A.; LIU, J. P. Enhancement of the immunogenicity of an infectious laryngotracheitis virus DNA vaccine by a bicistronic plasmid encoding glycoprotein B and interleukin-18. **Antiviral Research**, v. 87, p. 235–241, 2010.

CHIN, R. P.; GARCÍA, M.; CORSIGLIA, C.; RIBLET, S.; CRESPO, R.; SHIVAPRASAD, H. L.; RODRÍGUEZ-AVILA, A.; WOOLCOCK, R. P.; FRANÇA, M. Intervention strategies for laryngotracheitis : impact of extended downtime and enhanced biosecurity auditing. **Avian Diseases**, v. 53, p. 574–577, 2009.

CLARKE, J. K.; ROBERTSON, G. M.; PURCELL, D. A. Spray vaccination of chicken using infectious laryngotracheitis virus. **Australian Veterinary Journal**, v. 56, p. 424–28. 1980.

COUTO, R. M. Caracterização patológica e molecular do vírus da laringotraqueite infecciosa e diagnóstico diferencial em aves comerciais no estado de Minas Gerais. 2014. 100p. - Dissertação (Mestrado) Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

COUTO, R. M.; PREIS, I. S.; BRAGA, J. F. V.; BRASIL, B. S. A. F.; DRUMMOND, M. G.; MARTINS, N. R. S.; ECCO, R. Molecular characterization of infectious laryngotracheitis virus in naturally infected egg layer chickens in a multi-age flock in Brazil. **Archives of Virology**, v. 160, n. 1, p. 241–252, 2014.

COPPO, M. J. C.; HARTLEY, C. A.; DEVLIN, J. M. Immune responses to infectious laryngotracheitis virus. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 41, p. 454–462. 2013.

COPPO, M. J. C.; NOORMOHAMMADI, A. H.; BROWNING, G. F.; DEVLIN, J. M. Challenges and recent advancements in infectious laryngotracheitis virus vaccines. **Avian Pathology**, v. 42, n. 3, p. 195–205, 2013.

CRESPO, R.; WOOLCOCK, P. R.; CHIN, R. P.; SHIVAPRASAD, H. L.; GARCIA, M. Comparison of diagnostics techniques in an outbreak of infectious laryngotracheitis from meat chickens. **Avian Diseases**, v. 51, n. 4, p. 858–862, 2007.

DAVISON, S.; GINGERICH, E. N.; CASAVANT, S.; ECKROADE, R. J. Evaluation of the Efficacy of a Live Fowlpox-Vectored Infectious Laryngotracheitis/Avian Encephalomyelitis Vaccine Against ILT Viral Challenge. **Avian Diseases**, v. 50, p. 50–54, 2006.

DEVLIN, J. M.; BROWNING, G. F.; GILKERSON, J. R.; FENTON, S. P.; HARTLEY, C. A. Comparison of the safety and protective efficacy of vaccination with glycoprotein-G-deficient infectious laryngotracheitis virus delivered via eye-drop, drinking water or aerosol. **Avian Pathology**, v. 37, p. 83–88, 2008.

DEVLIN, J. M.; BROWNING, G. F.; HARTLEY, C. A.; KIRKPATRICK, N. C.; MAHMOUDIAN, A.; NOORMOHAMMADI, A. H.; GILKERSON, J. R. Glycoprotein G is a virulence factor in infectious laryngotracheitis virus. **Journal of General Virology** v. 87, p. 2839–2847, 2006.

DUFOUR-ZAVALA, L. Epizootiology of infectious laryngotracheitis and presentation of an industry control program. **Avian Diseases**, v. 52, p. 1–7, 2008.

FAHEY, K. J.; BAGUST, T. J.; YORK, J. J. Laryngotracheitis herpesvirus infection in the chicken: The role of humoral antibody in immunity to a graded challenge infection. **Avian Pathology**, v. 12, p. 505–514, 1983.

FAHEY, K. J.; YORK, J. J. The role of mucosal antibody in immunity to infectious laryngotracheitis virus in chickens. **Journal of General Virology**, v. 71, p. 2401–2405, 1990.

FUCHS, W.; WIESNER, D.; VEITS, J.; TEIFKE, J. P.; METTENLEITER, T. C. In Vitro and in Vivo Relevance of Infectious Laryngotracheitis Virus gJ Proteins That Are Expressed from Spliced and Nonspliced mRNAs. **Journal of Virology**, v. 79, p. 705–716, 2005.

FULTON, R. M.; SCHRADER, D. L.; WILL, M. Effect of route of vaccination on the prevention of infectious laryngotracheitis in commercial egg-laying chickens. **Avian Diseases**, v. 44, n. 1, p. 8–16, 2000.

GARCÍA, M.; SPATZ, S.; GUY, J. S. Infectious Laryngotracheitis. In: SAIF, Y. M. GLISSON, J. R.; FADLY, A. M.; McDOUGALD, L. R.; NOLAN, L. K.; SWAYNE, D.E (Org.). **Diseases of Poultry**. 13th. ed. [S.l.]: Iowa States Press, 2014. p. 161–179.

GARCÍA, M.; RIBLET, S. M. Characterization of Infectious Laryngotracheitis Virus Isolates : Demonstration of Viral Subpopulations within Vaccine Preparations. **Avian Diseases**, v. 45, n. 3, p. 558–566, 2001.

GARCÍA, M.; VOLKENING, J.; RIBLET, S.; SPATZ, S. Genomic sequence analysis of the United States infectious laryngotracheitis vaccine strains chicken embryo origin (CEO) and tissue culture origin (TCO). **Virology**, v. 440, n. 1, p. 64–74, 2013.

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

GHARAIBEH, S.; MAHMOUD, K.; AL-NATOUR, M. Field evaluation of maternal antibody transfer to a group of pathogens in meat-type chickens. **Poultry Science**, v. 87, p. 1550–1555, 2008.

GUY, J. S.; BARNES, H. J.; SMITH, L. Increased virulence of modified-live infectious laryngotracheitis vaccine virus following bird-to-bird passage. **Avian Diseases**, v. 35, p. 348–355, 1991.

GUY, J. S.; BARNES, H. J.; SMITH, L. G. Rapid diagnosis of infectious laryngotracheitis using a monoclonal antibody based immunoperoxidase procedure. **Avian Pathology**, v. 21, p.77–86, 1992.

GUY, J. S; GARCIA, M. Laryngotraqueitis. In: SAIF, Y. M. GLISSON, J. R.; FADLY, A. M.; McDOUGALD, L. R.; NOLAN, L. K.; SWAYNE, D.E (Org.). **Diseases of Poultry**. 12th. ed. [S.l.]: Iowa States Press, 2008 p. 137–152.

HAN, M. G.; KIM, S. J. Analysis of Korean strains of infectious laryngotracheitis virus by nucleotide sequences and restriction fragment length polymorphism. **Veterinary Microbiology**, v. 83, p. 321–331, 2001.

HELPERICH, D.; VEITS, J.; METTENLEITER, T. C.; FUCHS, W. The UL47 gene of avian infectious laryngotracheitis virus is not essential for in vitro replication but is relevant for virulence in chickens. **Journal of General Virology**, v. 88, p. 719–731, 2007.

HILBINK, F. W.; OEI, H. L.; ROOZELAAR-VAN, D. J. Virulence of five vaccines against avian infectious laryngotracheitis and their immunogenicity and spread after eye-drop or spray application. **Veterinary Quarterly**, v. 9, p. 215–255, 1987.

HIDALGO, H. Infectious Laryngotracheitis: A Review. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v.5, p. 157–168, 2003.

HIPÓLITO, O.; SOARES, L. A.; PEREIRA, O. A. C.; PINTO, A. A.; BOTTINO, J. A. Isolamento e identificação do vírus da laringotraqueíte infecciosa das galinhas no Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 5., 1974, Rio de Janeiro, RJ, 1974.

HITCHENER, S. B.; FABRICANT, J; BAGUST, T. J. A fluorescent-antibody study of the pathogenesis of infectious laryngotracheitis. **Avian Diseases**, v. 21, p. 185–194, 1977.

HUGHES, C. S.; GASKELL, R. M.; JONES, R. C.; BRADBURY, J. M.; JORDAN, F. T. Effects of certain stress factors on the re-excretion of infectious laryngotracheitis virus from latency infected carrier birds. **Research in Veterinary Science**, v. 46, p. 274–276, 1989.

HUGHES, C. S.; JONES, R. C. Comparison of cultural methods for primary isolation of infectious laryngotracheitis virus from field material. **Avian Pathology**, v. 17, p. 295–303, 1988.

HUGHES, C. S.; WILLIAMS, R. A.; GASKELL, R. M.; JORDAN, F. T. W.; BRADBURY, J. M.; BENNETT, M.; JONES, R. C. Latency reactivation of infectious laryngotracheitis vaccine virus. **Archives of Virology**, v. 121, p. 213–218, 1991.

ITO, N. M. K.; GAMA, N. M. S. Q.; MIYAJI, C. I.; OKABAYASHI, S.; LIMA, E. M.; BABADOPULOS, P. Diagnóstico da laringotraqueíte infecciosa das galinhas. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 5, p. 118-124, 2003.

JOHNSON, M. A.; PRIDEAUX, C. T.; KONGSUWAN, K.; SHEPPARD, M.; FAHEY, K. J. Gallid herpesvirus 1 (infectious laryngotracheitis virus): Cloning and physical maps of the SA-2 strain. **Archives of Virology**, v. 119, p. 181–198, 1991.

JOHNSON, M. A.; TYACK, S. G. Molecular evolution of infectious laryngotracheitis virus (ILTV; gallid herpesvirus 1): an ancient example of the Alphaherpesviridae? **Veterinary Microbiology**, v. 46, p. 221–231, 1995.

JOHNSON, Y. J.; GEDAMU, N.; COLBY, M. M.; MYINT, M. S.; STEELE, S. E.; SALEM, M.; ABLANTE, N. L. Wind-borne transmission of infectious laryngotracheitis between commercial poultry operations. **International Journal of Poultry Science**, v. 4, p. 263–267, 2005.

JORDAN, F. T. W. Immunity to infectious laryngotracheitis. In: Ross ME, Payne LN, Freeman BM. editors. Avian Immunology. Edinburg, Scotland. **British Poultry Science Ltd**, v. 7, p. 245–254, 1981.

JORDAN, F. T. W. A review of the literature on the infectious laryngotracheitis (ILT). **Avian Diseases**, v. 10, p. 1–26, 1966.

JORDAN, F. T. W.; CHUBB, R. C. The agar gel diffusion technique in the diagnosis of infectious laryngotracheitis (ILT) and its differentiation from fowl pox. **Research in Veterinary Science**, v. 3, p. 245–255, 1962.

KEAM, L.; YORK, J. J.; SHEPPARD, M.; FAHEY, K. J. Detection of infectious laryngotracheitis virus in chickens using a non-radioactive DNA probe. **Avian Diseases**, v. 35, p. 257–262, 1991.

KEY, D. W.; GOUGH, B. C.; DERBYSHIRE, J. B.; NAGY, E. Development and Evaluation of a Non-isotopically Labeled DNA Probe for the Diagnosis of Infectious Laryngotracheitis. **Avian Diseases**, v. 38, p. 467–74, 1994.

KING, A. M. Q.; ADAMS, M. J.; CARSTENS, E. B.; LEFKOWITZ, E. J. **Ninth Report Of The International Committee On Taxonomy Of Viruses**. San Diego: Elsevier Academic Press, 2012. San Diego, 2012. p. 1344.

KINGSBURY, F. W.; JUNGHER, E. L. Indirect transmission of infectious laryngotracheitis in chickens. **Avian Diseases**, v. 2, p. 54-63, 1958.

KIRKPATRICK, N. C.; MAHMOUDIAN, A.; O'ROURKE, D.; NOORMOHAMMADI, A. H. Differentiation of infectious laryngotracheitis virus isolates by restriction fragment length polymorphic analysis of polymerase chain reaction products amplified from multiple genes. **Avian Diseases**, v. 50, p. 28–34, 2006.

KOTIW, M.; WILKS, C. R.; MAY, J. T. The effect of serial in vivo passage on the expression of virulence and DNA stability of an infectious laryngotracheitis virus strain of low virulence. **Veterinary Microbiology**, v. 45, p. 71–80, 1995.

LEISEQUIA, L. M. L. Impacto económico de laringotraqueitis infecciosa aviar en una granja de pollos de carne del departamento de Lima. 2013. 55p. Disertación Universidad Nacional Mayor de San Marcos, 2013.

LEE, S. W.; DEVLIN, J. M.; MARKHAM, J. F.; NOORMOHAMMADI, A. H.; BROWNING, G. F.; FICORILLI, N. P.; HARTLEY, C. A.; MARKHAM, P. F. Phylogenetic and Molecular Epidemiological Studies Reveal Evidence of Multiple Past Recombination Events between Infectious Laryngotracheitis Viruses. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, p. 55121, 2013.

MAY, H. G.; TITSLER, R. P. Tracheolaryngotracheitis in poultry. **Journal of American Veterinarian Medical Association**, v. 67, p. 229–231, 1925.

MENENDEZ, K. R.; GARCÍA, M.; SPATZ, S.; TABLANTE, N. L. Molecular epidemiology of infectious laryngotracheitis: a review. **Avian Pathology**, v. 43, p. 108–117, 2014.

NAGY, E. Detection of infectious laryngotracheitis virus infected cells with cloned DNA probes. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 56, p. 34–40, 1992.

NEIGHBOUR, N. K.; NEWBERRY, L. A.; BAYYARI, G. R.; SKEELES, J. K.; BEASLEY, J. N.; McNEW, R. W. The effect of microaerosolized hydrogen peroxide on bacterial and viral poultry pathogens. **Poultry Science**, v. 73, p. 1511–1516, 1994.

NIELSEN, O. L.; HANDBERG, K. J.; JORGENSEN, P. H. In situ hybridization for the detection of infectious laryngotracheitis virus in section of trachea from experimentally infected chickens. **Acta Veterinaria Scandinava**, v. 39, p. 415–421, 1998.

OLDONI, I.; GARCÍA, M. Characterization of infectious laryngotracheitis virus isolates from the US by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism of multiple genome regions. **Avian Pathology**, v. 36, p. 167–176, 2007.

OU, S. C.; GIAMBRONE, J. J. Infectious laryngotracheitis virus in chickens. **World Journal of Virology**, v. 1, p. 142–149, 2012b.

OU, S. C.; GIAMBRONE, J. J.; MACKLIN, K, S. Comparison of a TaqMan real-time polymerase chain reaction assay with a loop-mediated isothermal amplification assay for detection of Gallid herpesvirus 1. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 24, p. 138–141, 2012.

OU, S. C.; GIAMBRONE, J. J.; MACKLIN, K. S. Detection of infectious laryngotracheitis virus from darkling beetles and their immature stage (lesser mealworms) by quantitative polymerase chain reaction and virus isolation. **Journal Applied Poultry Research**, v. 21, p. 33–38, 2012a.

OU, S. C.; GIAMBRONE, J. J.; MACKLIN, K. S. Infectious laryngotracheitis vaccine virus detection in water lines and effectiveness of sanitizers for inactivating the virus. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 20, p. 223–230, 2011.

PARRA, S. H. S.; NUÑEZ, L. F. N.; ASTOLFI-FERREIRA, C. S.; FERREIRA, A. J. P. Occurrence of Infectious Laryngotracheitis Virus (ILTV) in 2009-2013 in the state of São Paulo – Brazil. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 17, p. 117–120, 2015a.

PARRA, S. H. S.; NUÑEZ, L. F. N.; ASTOLFI-FERREIRA, C. S.; FERREIRA, A. J. P. Persistence of the tissue culture origin vaccine for infectious laryngotracheitis virus in commercial chicken flocks in Brazil. **Poultry Science**, p. 2608–2615, 2015b.

PAVLOVA, S. P.; VEITS, J.; BLOHM, U.; MARESCH, C.; METTENLEITER, T. C.; FUCHS, W. In vitro and in vivo characterization of glycoprotein C-deleted infectious laryngotracheitis virus. **Journal of General Virology**, v. 91, p. 847–857, 2010.

PAVLOVA, S. P.; VEITS, J.; KEIL, G. M.; METTENLEITER, T. C.; FUCHS, W. Protection of chickens against H5N1 highly pathogenic avian influenza virus infection by live vaccination with infectious laryngotracheitis virus recombinants expressing H5 hemagglutinin and N1 neuraminidase. **Vaccine**, v. 27, p. 773–785, 2009.

PIROZOK, R. P.; HELMBOLT, C. F.; JUNGHER, E. L. A rapid histological technique for the diagnosis of infectious avian laryngotracheitis. **Journal of American Veterinarian Medical Association**, v. 130, p. 406–407, 1957.

PORTZ, C.; BELTRAO, N.; FURIAN, T. Q.; JÚNIOR, A. B.; MACAGNAN, M.; GRIEBELER, J.; ROSA, A. V.; COLODEL, E. M.; DRIEMEIER, D.; BACK, A.; SCHATZMAYR, O. M. B.; CANAL, C. W. Natural infection of turkeys by infectious laryngotracheitis virus. **Veterinary Microbiology**, v. 131, p. 57–64, 2008.

PREIS, I. S.; BRAGA, J. F. V.; COUTO, R. M.; BRASIL, B. S. A. F.; MARTINS, N. S. R.; ECCO, R. Outbreak of infectious laryngotracheitis in large multi-age egg layer chicken flocks in Minas Gerais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, p. 591–596, 2013.

RAGGI, L. G.; BROWNELL, J. R.; STEWART, G. F. Effect of infectious laryngotracheitis on egg production and quality. **Poultry Science**, v. 40, p. 134–140, 1961.

ROBERTSON, G. M.; EGERTON, J. R. Replication of infectious laryngotracheitis virus in chickens following vaccination. **Australian Veterinary Journal**, v. 57, p. 119–123, 1981.

RODRÍGUEZ AVILA, A.; OLDONI, I.; RIBLET, S.; GARCÍA, M. Replication and Transmission of Live Attenuated Infectious Laryngotracheitis Virus (ILT_V) Vaccines. **Avian Diseases**, v. 51, n. 4, p. 905–911, 2007.

ROJAS, L. A. O. Influencia de la laringotraqueítis infecciosa (Gallid Herpesvirus 1) en el comportamiento productivo de pollos broiler en el cantón Cumandá provincia de Chimborazo, y en el cantón General Antonio Elizalde provincia del Guayas. 82p. Disertación (Maestría) - Instituto de Postgrado y Educación Continua, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, 2014.

SAMBERG, Y.; CUPERSTEIN, E.; BENDHEIM, U.; ARONOVICI, I. The development of a vaccine against avian infectious laryngotracheitis. IV. Immunization of chickens with a modified laryngotracheitis vaccine in the drinking water. **Avian Diseases**, v. 15, n. 2, p. 413–417, 1971.

SCHNITZLEIN, W. M.; RADZEVICIUS, J.; TRIPATHY, D. N. Propagation of Infectious Laryngotracheitis Virus in an Avian Liver Cell Line. **Avian Diseases**, v. 38, n. 2, p. 211–217, 1994.

SELLERS, H. S.; GARCÍA, M.; GLISSON, J. R.; BROWN, T. P.; JEAN, S.; GUY, J. S. Mild Infectious Laryngotracheitis in Broilers in the Southeast. **Avian Diseases**, v. 48, n. 2, p. 430–436, 2004.

SEVOIAN, M. A. quick method for the diagnosis of avian pox and infectious laryngotracheitis. **Avian Diseases**, v. 4, p. 474–477, 1960.

SOARES, L. A.; PEREIRA, O. A. C.; HIPÓLITO, O. Characterization of the first strain of infectious laryngotracheitis virus (ILTV) in Brazil chicken. **Revue of Microbiology**, v. 11, p. 104–109, 1980.

TONG, G. Z.; ZHANG, S. J.; MENG, S. S.; WANG, L.; QUI, H. J.; WANG, Y. F.; WANG, M. Protection of chickens from infectious laryngotracheitis with a recombinant fowlpox virus expressing glycoprotein B of infectious laryngotracheitis virus. **Avian Pathology**, v. 30, p. 143–148, 2001.

TRIST, H. M.; TYACK, S. G.; JOHNSON, M. A.; PRIDEAUX, C. T.; SHEPPARD, M. Comparison of the Genomic Short Regions of a Vaccine Strain (SA-2) and a Virulent Strain (CSW-1) of Infectious Laryngotracheitis Virus (Galid herpesvirus 1). **Avian Diseases**, v. 40, n. 1, p. 130–139, 1996.

VAGNOZZI, A.; ZAVALA, G.; RIBLET, S. M.; MUNDT, A.; GARCÍA, M. Protection induced by commercially available live-attenuated and recombinant viral vector vaccines against infectious laryngotracheitis virus in broiler chickens. **Avian Pathology**, v. 41, n. 1, p. 21–31, 2012.

VARGAS, R. E. S. Laringotraqueíte infecciosa das aves: Estudo epidemiológico em plantéis avícolas no Estado do Rio Grande do Sul. 1995, 104p. Dissertação [Mestrado] - Universidade Federal de Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1995.

VEITS, J.; LUSCHOW, D.; KINDERMANN, K.; WERNER, O.; TEIFKE, J. P.; METTENLEITER, T. C.; FUCHS, W. Deletion of the non-essential UL0 gene of infectious laryngotracheitis (ILT) virus leads to attenuation in chickens, and UL0 mutants expressing influenza virus haemagglutinin (H7) protect against ILT and fowl plague. **Journal of General Virology**, v. 84, p. 3343–335

WANASAWAENG, W.; CHANSIRIPORNCHAI, N. Molecular classification of

infectious laryngotracheitis virus from chick embryo origin vaccine , tissue culture origin vaccine and field isolates. **Thai Journal Veterinary Medicine**, v. 40, n. 4, p. 393–398, 2010.

WILKS, C. R.; KOGAN, V. G. An immunofluorescence diagnostic test for avian infectious laryngotracheitis. **Australian Veterinary Journal**, v. 55, p. 385–388, 1979.

WILLIAMS, R. A.; BENNETT, M.; BRADBURY, J. M.; GASKELL, R. M.; JONES, R. C.; JORDAN, F. T. W. Demonstration of sites of latency of infectious laryngotracheitis virus using the polymerase chain reaction. **Journal of General Virology**, v. 73, p. 2415–2420, 1992.

WILLIAMS, R. A.; SAVAGE, C. E.; JONES, R. C. A comparison of direct electron microscopy , virus isolation and a DNA amplification method for the detection of avian infectious laryngotracheitis virus in field material. **Avian Pathology**, v. 23, p. 709–720, 1994.

WANG, L. G.; MA, J.; XUE, C. Y.; WANG, W.; GUO, C.; CHEN, F.; QIN, J. P.; HUANG, N. H.; BI, Y. Z.; CAO, Y. C. Dynamic distribution and tissue tropism of infectious laryngotracheitis virus in experimentally infected chickens. **Archives of Virology**, v. 158, n. 3, p. 659–666, 2013.

YAMADA, S.; MATSUO, K.; FUKUDA, T.; UCHINUNO, Y. Susceptibility of ducks to the virus of infectious laryngotracheitis. **Avian Diseases**, v. 24, p. 930–938, 1980.

YORK, J. J.; FAHEY, K. J. Humoral and cell-mediated immune responses to the glycoproteins of infectious laryngotracheitis herpesvirus. **Archives of Virology**, v. 115, p. 289–297, 1990.

YORK, J. J.; YOUNG, J. G.; FAHEY, K. J. The appearance of viral antigen and antibody in the trachea of naive and vaccinated chickens infected with infectious laryngotracheitis virus. **Avian Pathology**, v. 18, p. 643–658, 1989.

ZHAO, Y.; KONG, C.; CUI, X.; CUI, H.; SHI, X.; ZHANG, X.; HU, S.; HAO, L.; WANG, Y. Detection of infectious laryngotracheitis virus by real-time PCR in naturally and experimentally infected chickens. **PloS ONE**, v. 8, p. 1–10, 2013.

3 DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO VÍRUS DA LARINGOTRAQUEÍTE INFECCIOSA (VLT) EM AVES COM PROBLEMAS RESPIRATÓRIOS

3.1 INTRODUÇÃO

A Laringotraqueíte infecciosa (LTI) é uma doença altamente contagiosa que afeta o trato respiratório das aves, se encontra na lista de doenças de notificação obrigatória da Organização Mundial de Sanidade Animal (OIE) (<http://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/oie-listed-diseases-2016/>). O agente causador é um *Gallid herpesvirus tipo 1* (GaHV-1) membro da família *Herpesviridae* e do gênero *Altovirus* (DAVISON et al., 2009). Causa grandes perdas econômicas devido perdas de peso, diminuição da produção de ovos, elevada morbidade e mortalidade e a susceptibilidade a outros patógenos respiratórios (GARCIA; SPATZ; GUY, 2014). As infecções variam de acordo com a virulência das estirpes virais, apresentando-se de forma subclínica com baixa mortalidade ou de forma grave na qual existe elevada mortalidade (GARCÍA; RIBLET, 2001).

A LTI foi a primeira doença aviária para a qual foi desenvolvida uma vacina eficaz (GARCIA; SPATZ; GUY, 2014), como a vacina CEO (*cell embryo origin*) (SAMBERG et al., 1971; HITCHENER; FABRICANT; BAGUST, 1977; HILBINK; OEI; ROOZELAAR, 1987); a vacina TCO (*tissue cell origin*) (GELENCZEI; MARTY, 1964; FULTON; SCHRADER; WILL, 2000), porém, estes tipos de vacinas podem produzir reversão da virulência e causar a doença (HUGHES et al., 1991); sendo assim, nos últimos anos foram desenvolvidas uma geração nova de vacinas utilizando vetores para a expressão de genes do GaHV-1 (COPPO et al., 2013; GARCÍA et al., 2013) e que em associação com as boas práticas de biossegurança poderiam ser utilizadas como parte de programas para a erradicação da doença (BAGUST; JOHNSON, 1995; DUFOUR-ZAVALA, 2008).

Diversas técnicas moleculares foram utilizadas para a caracterização do vírus, tais como: PCR, RFLP, qPCR e sequenciamento do DNA (CHACON; MIZUMA; FERREIRA, 2010), estas técnicas foram utilizadas para se conhecer a origem do vírus, (campo ou vacinal), para o monitoramento dos animais, para se realizar

estudos epidemiológicos e a identificação de possíveis eventos de recombinação (CHACON; FERREIRA, 2009; LEE et al., 2013).

O genoma do VLTI consiste em uma cadeia linear de fita dupla de aproximadamente 155 Kb (BAGUST; JONES; GUY, 2000); o gene ICP4 (*infected cell protein*) é um gene que se expressa antes do ciclo de replicação e é responsável pela regulação de genes precoces e tardios durante a infecção (JOHNSON, et al., 1995) e foi bastante usado em estudos epidemiológicos para se determinar a origem do vírus envolvido no surto (JOHNSON et al., 1995; CHACON; FERREIRA, 2009; COUTO et al., 2014); outro gene que foi utilizado para se diferenciar os isolados de alta ou baixa virulência é o gene TK (*thymidine kinase*), que se encontra localizado na região longa única (HAN; KIM, 2001).

No Brasil a LTI foi descrita no ano de 1974 pela primeira vez (HIPÓLITO et al., 1974) e a partir de essa data tem sido reportada até a atualidade. No ano 2002 houve um surto na região de Bastos (CHACON et al., 2007; CHACON; FERREIRA, 2009) e em 2010 existiu outro surto na região de Minas Gerais (PREIS et al., 2013) e que foi produzido por uma cepa não vacinal de baixa virulência (COUTO et al., 2014).

O objetivo deste estudo foi detectar e caracterizar usando uma abordagem molecular o VLTI em amostras de aves com problemas respiratórios nos anos de 2015-2016 enviadas ao Laboratório de Ornitopatologia (LABOR) da FMVZ-USP.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Amostras virais

No presente estudo foram analisadas quarenta e duas (42) amostras provenientes de aves com problemas respiratórios, tais como: edema facial, cabeça inchada e esticada, assim como a presença de espirros. Estas amostras eram provenientes das cidades de Guatapará e Barretos (São Paulo) e da cidade de Itanhandu (Minas Gerais) que foram enviadas ao LABOR-FMVZ-USP para o diagnóstico do VLTI (Quadro 1).

Quadro 1- Identificação das amostras

Identificação amostra	Tipo de amostra	Tipo de ave	Sinais clínicos	Ano	Origem da amostra
657-3	Traqueia	Postura comercial	Sim	2015	Guatapar
657-4	Trigêmeo	Postura comercial	Sim	2015	Guatapar
657-4	Pálpebra	Postura comercial	Sim	2015	Guatapar
657-5	Tonsila	Postura comercial	Sim	2015	Guatapar
657-7	Traqueia	Postura comercial	Sim	2015	Guatapar
695-1	Traqueia	Postura comercial	Sim	2016	Barretos
695-2	Pálpebra	Postura comercial	Sim	2016	Barretos
695-3	Trigêmeo	Postura comercial	Sim	2016	Barretos
729-1	Traqueia	Postura comercial	Sim	2016	Itanhandu

Fonte: (SANTANDER-PARRA, S. H., 2016)

3.2.2 Extração do DNA viral das amostras

O DNA viral das amostras e do controle positivo (vacina) foi extraído de acordo com o protocolo descrito por Chomczynski (1993), como controle negativo da reação foi usado um tampão fosfato salino (PBS) 0,1M, pH 7,4. O DNA foi dissolvido em 30L de tampão Tris-EDTA (TE) e armazenada a -20C até a realização dos testes moleculares e sequenciamento do DNA.

3.2.3 Triagem das amostras

As amostras foram triadas seguindo o protocolo do laboratório de Ornitopatologia (LABOR) para o diagnóstico de LTI, que amplifica um fragmento do gene que codifica a glicoproteína E (gE) usando o método descrito por Chacon; Ferreira (2008).

3.2.4 PCR dos genes ICP4 e TK

As amostras positivas foram submetidas a uma reação de PCR para amplificar dois fragmentos do gene ICP4 utilizando o método descrito por Chacon; Ferreira (2009). Na reação de PCR utilizou-se 0,5 μ M de cada um dos *primers* (ICP4-1F e ICP4-1R ou ICP4-2F e ICP4-2R) (Quadro 2), 2,5 μ L de tampão 10X, 4,0 μ L de dNTPs 1,25 mM, 37,5 mM de MgCl₂ e 1,25 U de TaqDNA polimerase Platinum, (*Invitrogen by Life Technologies, Carlsbad, CA, USA*) e 2,5 μ L de DNA. Água ultrapura livre de DNase foi adicionada a reação para se completar um volume de 25 μ L. A reação de amplificação ocorreu nas seguintes condições: 94°C/3 minutos para a desnaturação inicial seguida de 35 ciclos a 94°C/1 minuto, 62°C/1 minuto e 72°C/1,5 minutos e uma extensão final a 72°C/10 minutos.

Para o gene TK se adotou o protocolo descrito por Ham; Kim (2001). A reação de PCR continha 0,5 μ M de cada um dos *primers* (TKOPS e TKOPAS) (Quadro 2), 2,5 μ L de tampão 10X, 4,0 μ L de dNTPs 1,25 mM, 37,5 mM de MgCl₂ e 1,25 U de TaqDNA polimerase Platinum, (*Invitrogen by Life Technologies, Carlsbad, CA, USA*) e 2,5 μ L de DNA. Água ultrapura livre de DNase foi adicionada a reação para se completar um volume de 25 μ L. A reação de *Nested* ocorreu nas mesmas condições, exceto pelos *primers* (TKIPS e TKIPAS) e 2,5 μ L do produto amplificado na reação de PCR. As condições de amplificação foram 95°C/3 minutos, 35 ciclos de 94°C/1 minuto, 58°C/1,5 minutos e 72°C/2 minutos, seguidos por 72°C/10 minutos para a extensão final. As reações foram realizadas num termociclador Mastercycler Nexus X1 Eppendorf (*Eppendorf AG, Hamburg, Germany*).

Finalmente, uma alíquota de 10 µL do produto amplificado na reação de PCR (ICP4) ou *Nested-PCR* (TK) foram submetidos 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 usados para a amplificação dos genes ICP4 e TK

Primer	Sequência	Tamanho	Referência
ICP4-1F	ACTGATAGCTTTTCGTACAGCACG	687pb	CHACON; FERREIRA, 2009
ICP4-1R	CATCGGGACATTCTCCAGGTAGCA		
ICP4-2F	CTTCAGACTCCAGCTCATCTG	631pb	
ICP4-2R	AGTCATGCGTCTATGGCGTTGAC		
TKOPS	ATCGTATAGGCCAGCCTT	1296pb	HAN; KIM, 2001
TKOPAS	CCACGCTCTCTCGAGTAA		
TKIPS	CTTAGCGGAACCTATGCAAG	649pb	
TKIPAS	TAGCGTCTGGTCGATTGAAG		

Fonte: (SANTANDER-PARRA, S. H., 2016)

3.2.5 Sequenciamento de DNA

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)*.

3.2.6 Edição e análise das sequências

Após o processo de sequenciamento e de leitura das sequências, os eletroforegramas foram editados e alinhados usando os softwares *CLC Main Workbench 7.0.2* e *Bioedit versão 7.1.3 Biological Sequence Alignment Editor (Ibis Biosciences)*. As sequências geradas foram analisadas usando a ferramenta *BLAST* para se determinar a similaridade das sequências com aquelas depositadas no *GeneBank*. As sequências de nucleotídeos obtidas 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)*. As árvores filogenéticas foram inferidas usando diferentes métodos estatísticos e teste de filogenia 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).

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Triagem das amostras

De um total de 42 amostras, nove (9) amostras foram positivas para o gene que codifica a gE com um tamanho de aproximadamente 219 pb.

3.3.2 PCR dos genes ICP4 e TK

Todas as amostras positivas (n=9) analisadas neste estudo foram submetidas à amplificação de dois fragmentos do gene ICP4 o que resultou num produto de aproximadamente 687 pb para o fragmento 1 e de 631 pb para o fragmento 2;

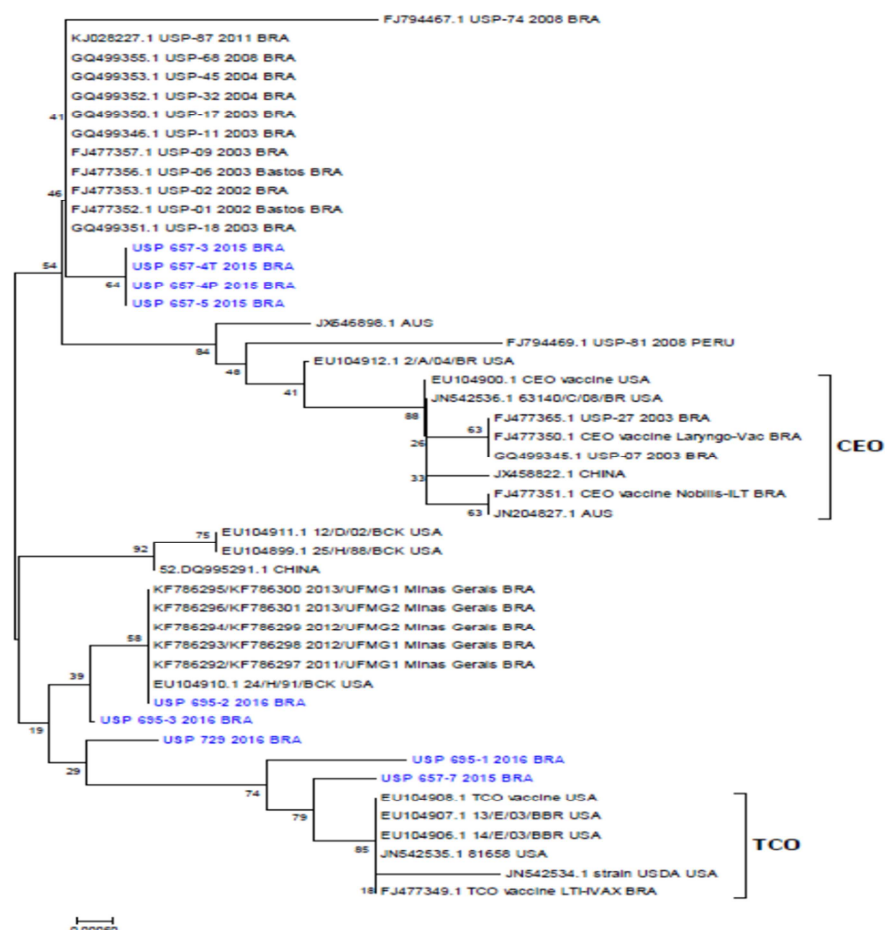
também foi realizada a amplificação do gene TK resultando num produto de aproximadamente 694 pb.

3.3.3 Sequenciamento de DNA do gene ICP4

O sequenciamento de DNA dos dois fragmentos do gene ICP4 permitiu a diferenciação de isolados tanto das vacinas (CEO e TCO) quanto de campo, identificando sete (07) amostras como cepas de campo e duas (02) amostras como cepas relacionadas a vacina TCO (Figura 1). Foram observadas também delações dos seguintes nucleotídeos C-T-C-T-T-C-C-T-C nas posições 736 até 744 respectivamente, nas amostras com a identificação 657 (Tabela 2).

As amostras do presente estudo mostraram ao ser analisadas entre elas uma similaridade de 98,4 – 100% de nucleotídeos (NT) e de 98,2 – 100 % aminoácidos (AA). Estas sequências ao ser comparadas com outras sequências de Brasil apresentaram uma identidade de 97,2 - 99,8% de NT e 97,2 -99,4 de AA para as sequências Bastos e uma identidade de 98,4 – 99,9% de NT e 97,9 – 99,7% AA para as sequências de Minas Gerais (MG), unicamente a amostra USP 695-2 mostrou uma similaridade de 100% de NT e AA com as sequências de MG. As sequências analisadas ao ser comparadas com as sequências das vacinas CEO mostraram uma similaridade de 97,2 – 98,3% de NT e 97,2 – 97,9% de AA, e ao ser comparadas com as sequências das vacinas TCO se observou uma similaridade de 98,3 – 99,6% de NT e 98,7 – 99,2% de AA. (Tabela 1).

Figura 1 - Árvore filogenética inferida usando as sequências dos dois segmentos do gene ICP4 das cepas estudadas, das sequências vacinais e de campo de outros países



Fonte: (SANTANDER-PARRA, S. H., 2016)

Legenda: A árvore filogenética foi construída utilizando o método estatístico *Neighbor-Joining* junto com o modelo *Kimura 2-parameter* com 1000 *Bootstrap* de replicação. A barra da escala representa o número de substituições por sítio. Em azul as sequências das cepas estudadas no presente trabalho.

A análise filogenética com base nas sequências do gene ICP4 mostraram que quatro amostras obtidas neste estudo (657-3, 657-4T, 657-4P, 657-5) foram agrupadas em um ramo separado dos outros isolados Brasileiros (Bastos-SP e Minas Gerais-MG). A amostra 695-2 foi agrupada no mesmo ramo das cepas de Minas Gerais e a amostra 695-3 está relacionada com estas amostras. A amostra 729 se encontra em um ramo separado, mas ainda relacionada com a vacina TCO.

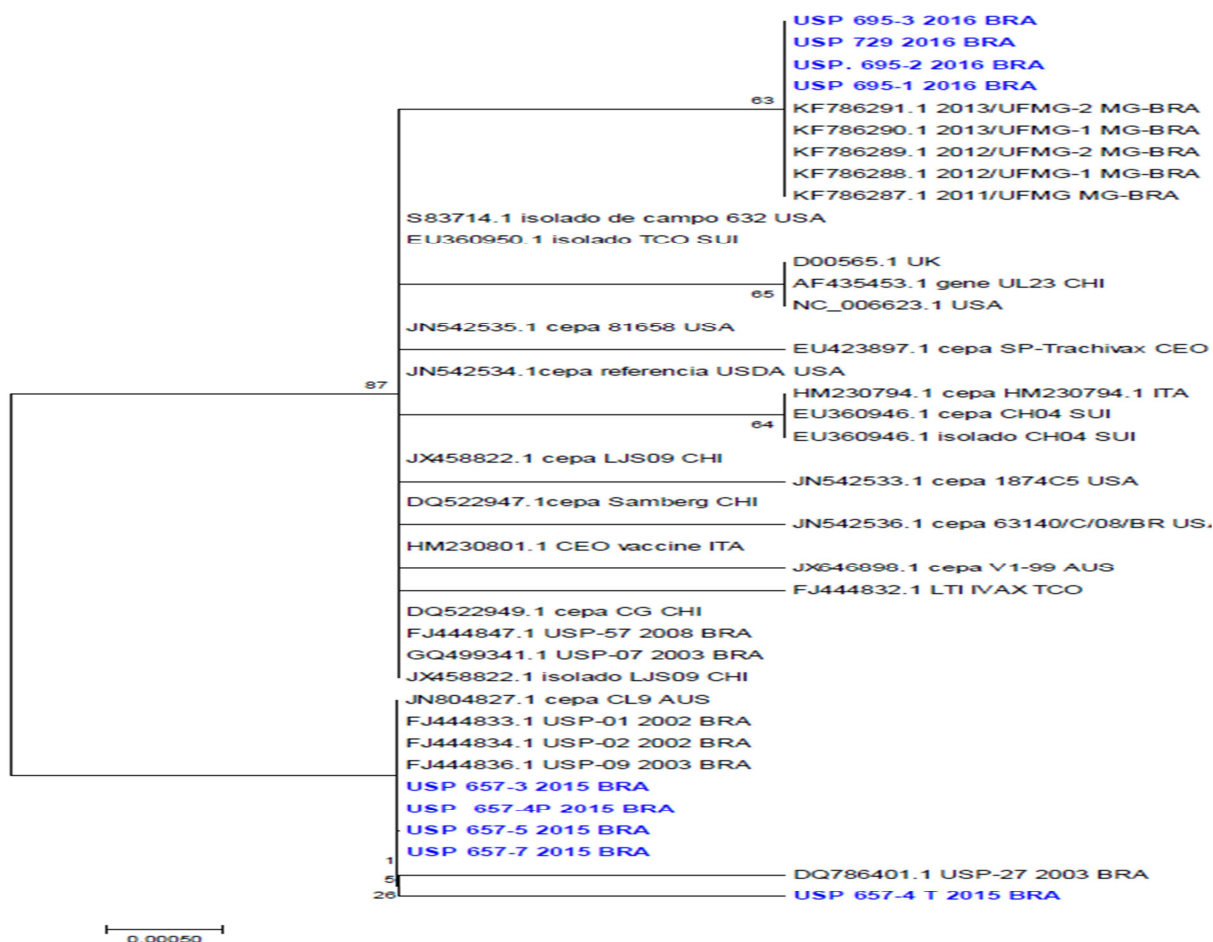
Duas amostras (695-1, 657-7) estão no ramo relacionado com a vacina TCO (Figura 1).

Os dois fragmentos do gene ICP4 foram analisados em conjunto. Assim, os sete isolados de campo se diferenciaram das cepas vacinais TCO e CEO (Figura 1) e as outras duas amostras foram relacionadas a vacina TCO.

3.3.4 Sequenciamento de DNA do gene TK

Como mostra a figura 2 a análise filogenética das sequências das amostras do gene de TK revelou que cinco sequências (657-3, 657-4P, 657-4T, 657-5, 657-7) se encontravam no mesmo ramo das amostras brasileiras caracterizadas como de alta virulência em outros estudos. As outras amostras (695-1, 695-2, 695-3, 729) foram colocadas em um ramo com as amostras responsáveis pelo surto em Minas Gerais caracterizadas anteriormente como de baixa virulência.

Figura 2 - Árvore filogenética gerada de um fragmento do gene TK do VLTI das cepas estudadas, das sequências de vacinas, de campo e de outros países

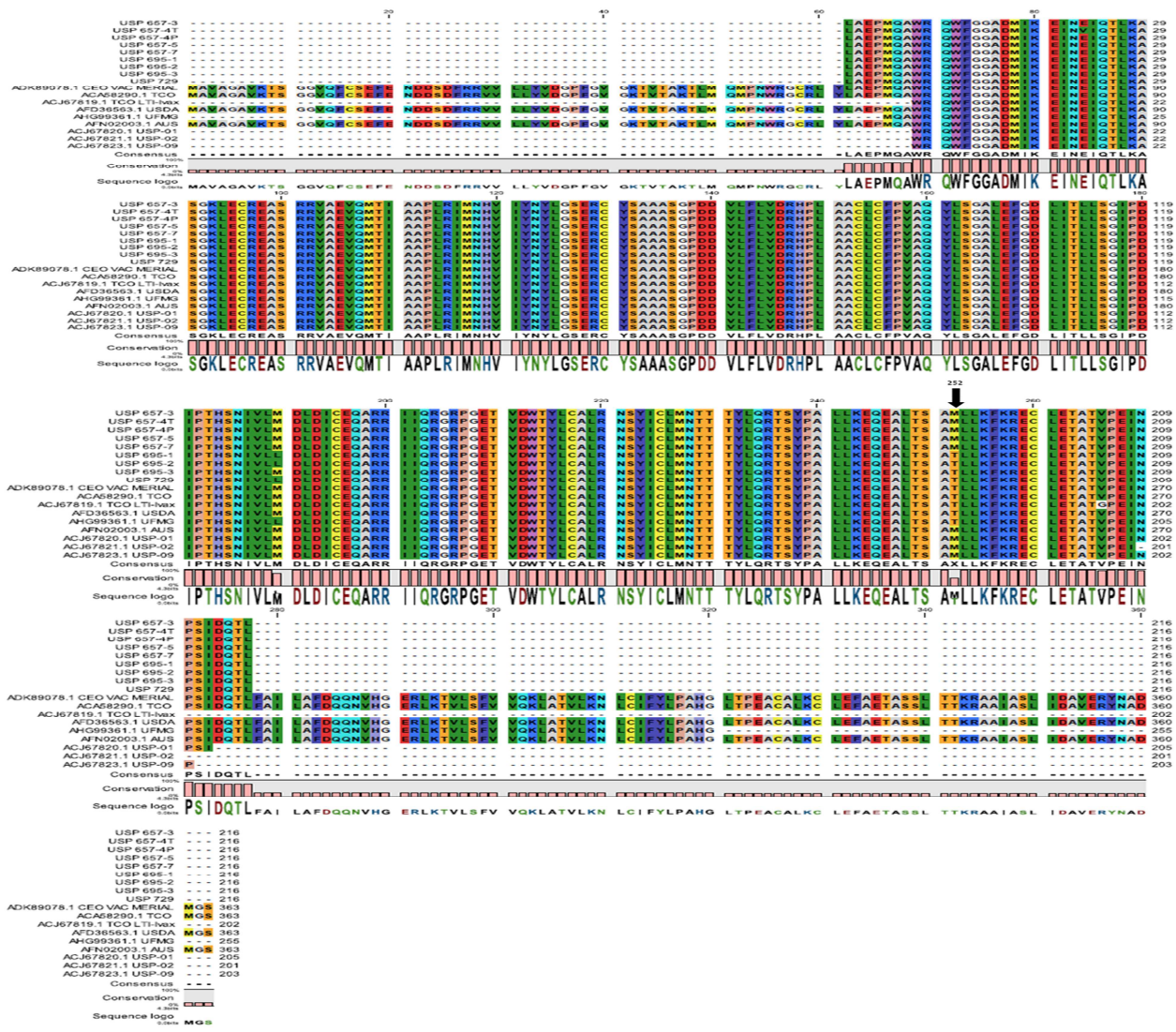


Fonte: (SANTANDER-PARRA, S. H., 2016)

Legenda: A árvore filogenética foi construída utilizando o método o método estadístico *Neighbor-Joining* junto com o modelo *Jukes-cantor* com 1000 *Bootstrap* de replicação. A barra da escala representa o número de substituições por sítio. Em azul as sequências das cepas estudadas no presente trabalho.

A análise das sequências de aminoácidos do gene TK geradas no presente trabalho mostraram que as amostras analisadas do ano de 2015 (657-3, 657-4P, 657-4T, 657-5, 657-7) apresentaram uma metionina (M) na posição 252 do gene, caracterizando-as como cepas de alta virulência e as sequências do ano de 2016 (695-1, 695-2, 695-3, 729) mostraram uma treonina (T) na mesma posição do gene, caracterizando estas amostras como de baixa virulência como se mostra na figura 3.

Figura 3 – Análise das sequências de um fragmento do gene TK geradas no presente estudo, com outras sequências correspondentes as vacinas CEO e TCO e de outros isolados, indicando a presença dos aminoácidos metionina e treonina na posição 252 do gene



Fonte: (SANTANDER-PARRA, S. H., 2016)

Legenda: A presença de uma metionina, na posição 252 do gene TK, mostra que é uma cepa de alta virulência enquanto a presença de treonina indica que é uma cepa de baixa virulência. A seta mostra a posição 252 na figura.

3.4 DISCUSSÃO

Estudos moleculares foram realizados para se definir a origem das amostras causadoras de surtos, se estes foram causados por cepas de vacinas ou de campo (OLDONI; GARCÍA, 2007; CHACON; MIZUMA; FERREIRA, 2010). Para se avaliar programas de controle numa determinada região e o aparecimento de novos surtos (CHACON et al., 2015).

Análises moleculares orientadas a amplificação do gene ICP4 são realizados habitualmente para a diferenciação entre cepas de vacinas daquelas de campo (CHACON; FERREIRA, 2009; COUTO et al., 2014; PARRA et al., 2015). Neste estudo este teste foi realizado para se conhecer se os sinais clínicos estavam sendo causados por uma cepa de vacina, produzido pelas cepas que causaram os surtos nas regiões de Bastos ou Minas Gerais (COUTO et al., 2014; CHACON et al., 2015) ou se existia uma nova cepa que estaria produzindo estes problemas respiratórios.

No Brasil, existiram alguns surtos que foram controlados através de vacinas TCO e CEO no bolsão de Bastos (Arco-Íris, Bastos, Herculândia, Iacri, Inúbia Paulista, Lucélia, Osvaldo Cruz, Parapuã, Pracinha, Queiroz, Rinópolis, Sagres, Salmourão e Tupã, do EDA de Tupã, e nos municípios de João Ramalho e Rancharia, do EDA de Presidente Prudente) e que posteriormente foram substituídas por uma vacina recombinante (CHACON, 2010; CHACON, et al., 2015). Em Minas Gerais (Pouso Alto, Itanhandu, Itamonte, Passa Quatro) a Agência Agrícola Governamental autorizou unicamente o uso de vacinas vectorizadas para controlar a doença e para prevenir o aparecimento de novos surtos (COUTO et al., 2014). Outro surto ocorreu em Guataparã no final do ano 2009 e começo de 2010 e a cepa causadora era uma cepa diferente das vacinas comerciais e de outras amostras de campo detectadas em outros surtos no país (LUCIANO et al., 2011). Dessa forma, a Agência Governamental autorizou a vacinação com a vacina TCO (portaria CDA-6 de 11/02/2011), e posteriormente, no ano 2013, autorizou o uso da vacina recombinante no incubatório (portaria CDA-40 de 05/07/2013).

As sequências de DNA obtidas no presente estudo mostraram que as cepas que estão circulando nos lotes de aves são de uma cepa de campo não vacinal, diferente das cepas que produziram os surtos em Bastos e Minas Gerais. Foram

também encontradas cepas relacionadas a vacina TCO. Estes resultados corroboram a eficácia da utilização do gene ICP4 para a tipificação dos isolados de LTI (CHANG et al., 1997; WANASAWAENG; CHANSIRIPORNCHAI, 2010; CHACON, et al., 2015). Também sugerem que esta nova cepa (657) que está relacionada com a cepa Bastos, possivelmente, esteja causando a doença, porque foi caracterizada de alta virulência; existindo estudos que demonstraram que podem existir surtos causados por cepas de campo (ISLAM et al., 2010; DORMITORIO et al., 2013), e no Brasil já ocorreram surtos por cepas de campo de origem desconhecida (CHACON et al.; 2010; COUTO et al., 2014).

No presente estudo foram encontradas cepas de campo (traqueia, trigêmeo, pálpebra, tonsila) e cepas de vacinas (traqueia) em aves com sinais respiratórios; concordando com estudos anteriores que indicaram que o vírus da LTI pode se replicar ativamente na traqueia, conjuntiva e estabelecer infecção latente no trigêmeo (WILLIAMS et al., 1992; BAGUST; JOHNSON, 1995). Além disso, diversos estudos indicaram a presença do vírus em outros tecidos além dos respiratórios (WANG et al., 2013; PARRA et al., 2015).

Geralmente, a infecção pelo vírus da LTI ocorre pela reativação de infecções latentes (HUGHES et al., 1989; BAGUST; JOHNSON, 1995) ou pela presença de novas cepas as quais podem existir devido a uma reversão da virulência das vacinas ou pela passagem de ave para ave (RODRÍGUEZ AVILA et al., 2007), porém poucos surtos foram relatados em consequência a reversão da virulência da vacina TCO e sim à reversão da vacina CEO (OLDONI; GARCÍA, 2007). Neste estudo se demonstrou que a cepa encontrada em Itanhandu-MG é uma cepa de campo diferente da cepa que causou anteriormente um surto, e está relacionada com a vacina TCO, embora nesta região se utilize uma vacina vetorizada. Um estudo mostrou que vacinas vetorizadas em regiões com alto desafio, não oferece proteção completa contra a doença (JOHNSON et al., 2010). Outros estudos indicaram que ainda não se conhece quantos e qual é a proporção de lotes vacinados com vacinas recombinantes que verdadeiramente se encontram em risco em áreas de alto desafio, conseqüentemente mais estudos são necessários para se avaliar o desempenho desta vacina (VAGNOZZI et al., 2012).

Neste estudo se mostrou a presença do VLTI em áreas diferentes dos surtos ocorridos no Brasil, o seja, em Barretos, que se caracterizou como uma cepa

parecida com a cepa causadora do surto em Minas Gerais, onde existem programas para o controle da doença. Assim, um estudo epidemiológico recente mostrou que a utilização de vacinas CEO e TCO numa área de quarentena não foi capaz de eliminar a circulação da cepa de campo na região e que a vacina CEO e cepas selvagens podem se espalhar para regiões não vacinadas, apesar das medidas de biossegurança implementadas para seu controle (CHACON et al., 2015).

Este estudo encontrou deleção de nucleotídeos nas cepas que foram caracterizadas como cepas de campo (657), o que poderia indicar a sua virulência.

De acordo com os resultados da análise das sequências do gene TK foi possível a diferenciação entre cepas de alta ou baixa virulência, já que as cepas de alta virulência possuem o aminoácido metionina na posição 252 do gene, e as cepas de baixa virulência ou vacinais possuem o aminoácido treonina na mesma posição (HAN; KIM, 2001).

3.5 CONCLUSÃO

A caracterização dos dois fragmentos do gene ICP4 e um fragmento do gene TK no presente trabalho sugere que o vírus que se encontra em circulação nos lotes de aves comerciais, causando problemas respiratórios é uma cepa de campo de alta virulência (amostra 657). Ocorreu também a caracterização de amostras relacionadas à vacina TCO de baixa virulência (amostras 695 e 729), existindo a possibilidade de que os sinais clínicos apresentados sejam resultado de uma infecção latente reativada ou seja uma reversão de virulência da vacina. Dessa forma, é importante o monitoramento constante das áreas afetadas com a finalidade de se evitar o aparecimento de novos surtos que produziriam grandes perdas econômicas à indústria avícola.

REFERÊNCIAS

BAGUST, T. J.; JOHNSON, M. A. Avian infectious laryngotracheitis: Virus-host interactions in relation to prospects for eradication. **Avian Pathology**, v. 24, n. 3, p. 373–391, 1995.

BAGUST, T. J.; JONES, R. C.; GUY, J. S. Avian infectious laryngotracheitis. **Revue Scientifique et Technique-office International des Epizootiespizooties**, v. 19, n. 2, p. 483–492, 2000.

CHACON, J. L.; BRANDAO, P. E. B.; VILLAREAL, L. Y. B.; GAMA, N. M.; FERREIRA, A. J. P. Survey of Infectious Laryngotracheitis Outbreak in Layer Hens and Differential Diagnosis with other Respiratory Pathogens. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 9, p. 61–67, 2007.

CHACON, J. L.; FERREIRA, A. J. P. Development and validation of nested-PCR for the diagnosis of clinical and subclinical infectious laryngotracheitis. **Journal of Virological Methods**, v. 151, p. 188–93, 2008.

CHACON, J. L.; FERREIRA, A. J. P. Differentiation of field isolates and vaccine strains of infectious laryngotracheitis virus by DNA sequencing. **Vaccine**, v. 27, n. 48, p. 6731–6738, 2009.

CHACON, J. L.; MIZUMA, M. Y.; PIANTINO FERREIRA, A. J. Characterization by restriction fragment length polymorphism and sequence analysis of field and vaccine strains of infectious laryngotracheitis virus involved in severe outbreaks. **Avian Pathology**, v. 39, n. 6, p. 425–433, 2010.

CHACON, J. L.; NARANJO, L. F. N.; VEJARANO, M. P.; PARRA, S. H. S.; ASTOLFI-FERREIRA, C.; FERREIRA, A. J. P. Persistence and spreading of field and vaccine strains of infectious laryngotracheitis virus (ILTV) in vaccinated and unvaccinated geographic regions, in Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, v. 47, n. 6, p. 1101–1108, 2015.

CHANG, P. C.; LEE, Y. L.; SHIEN, J. H.; SHIEH, H. K. Rapid differentiation of vaccine strains and field isolates of infectious laryngotracheitis virus by restriction fragment length polymorphism of PCR products. **Journal of Virology Methods**, v. 66, p. 179–186, 1997.

CHOMCZYNSKI, P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and protein for the cell and tissues samples. **Biotechniques**, v. 15, p. 532–536, 1993.

COPPO, M. J. C.; NOORMOHAMMADI, A. H.; BROWNING, G. F.; DEVLIN, J. M. Challenges and recent advancements in infectious laryngotracheitis virus vaccines. **Avian Pathology**, v. 42, n. 3, p. 195–205, 2013.

COUTO, R. M.; PREIS, I. S.; BRAGA, J. F. V.; BRASIL, B. S. A. F.; DRUMMOND, M. G.; MARTINS, N. R. S.; ECCO, R. Molecular characterization of infectious laryngotracheitis virus in naturally infected egg layer chickens in a multi-age flock in Brazil. **Archives of Virology**, v. 160, n. 1, p. 241–252, 2014.

DAVISON, A. J.; EBERLE, R.; EHLERS, B.; HAYWARD, G. S.; McGEOCH, J. D.; MINSON, A. C.; PELLETT, P. E.; ROIZMAN, B.; STUDDERT, M. J.; THIRY, E. The order herpesvirales. **Archives of Virology**, v. 154, n. 1, p. 171–177, 2009.

DORMITORIO, T. V.; GIAMBRONE, J. J.; MACKLIN, K. S. Detection and isolation of infectious laryngotracheitis virus on a broiler farm after a disease outbreak. **BioOne**, v. 57, n. 4, p. 803–807, 2013.

DUFOUR-ZAVALA, L. Epizootiology of infectious laryngotracheitis and presentation of an industry control program. **Avian Diseases**, v. 52, p. 1–7, 2008.

FULTON, R. M.; SCHRADER, D. L.; WILL, M. Effect of route of vaccination on the prevention of infectious laryngotracheitis in commercial egg-laying chickens. **Avian Diseases**, v. 44, n. 1, p. 8–16, 2000.

GARCÍA, M.; RIBLET, S. M. Characterization of Infectious Laryngotracheitis Virus Isolates : Demonstration of Viral Subpopulations within Vaccine Preparations. **Avian Diseases**, v. 45, n. 3, p. 558–566, 2001.

GARCIA, M.; SPATZ, S.; GUY, J. S. Infectious Laryngotracheitis. In: SAIF, Y. M.; FADLY, M. A.; GLISSON, J. R.; MCDUGALD, L. R.; NOLAN, L. K.; SWAYNE, D. E. (Org.). **Diseases of Poultry**. 13th. ed. [S.l.]: Iowa States Press, 2014. p. 161–179.

GARCÍA, M.; VOLKENING, J.; RIBLET, S.; SPATZ, S. Genomic sequence analysis of the United States infectious laryngotracheitis vaccine strains chicken embryo origin (CEO) and tissue culture origin (TCO). **Virology**, v. 440, n. 1, p. 64–74, 2013.

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

HAN, M. G; KIM., S. J. Analysis of Korean strains of infectious laryngotracheitis virus by nucleotide sequences and restriction fragment length polymorphism. **Veterinary Microbiology**, v. 83, p. 321–331, 2001.

HILBINK, F. W.; OEI, H. L.; ROOZELAAR VAN, D. J. Virulence of five vaccines against avian infectious laryngotracheitis and their immunogenicity and spread after eye-drop or spray application. **Veterinary Quarterly**, v. 9, p. 215–255, 1987.

HIPÓLITO, O.; SOARES, L. A.; PEREIRA, O. A. C.; PINTO, A. A.; BOTTINO, J. A. Isolamento e identificação do vírus da laringotraqueíte infecciosa das galinhas no Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 1974, Rio de Janeiro. Anais do evento 1974, p. 16.

HITCHENER, S. B; FABRICANT, J; BAGUST, T. J. A fluorescent-antibody study of the pathogenesis of infectious laryngotracheitis. **Avian Diseases**, v. 21, p. 185–194, 1977.

HUGHES, C. S.; GASKELL, R. M.; JONES, R. C; BRADBURY, J. M.; JORDAN, F. T. Effects of certain stress factors on the re-excretion of infectious laryngotracheitis virus from latently infected carrier birds. **Research in Veterinary Science**, v. 46, p. 274–276, 1989.

HUGHES, C. S.; WILLIAMS, R. A.; GASKELL, R. M.; JORDAN, F. T. W.; BRADBURY, J. M.; BENNETT, M.; JONES, R. C. Latency reactivation of infectious laryngotracheitis vaccine virus. **Archives of Virology**, v. 121, p. 213–218, 1991.

ISLAM, M. S.; KHAN, M. S. R.; ISLAM, M. A.; HASSAN, J.; AFFROZE, S.; ISLAM, M.A. Isolation and characterization of infectious laryngotracheitis virus in layer chickens. **Blangadesh Journal of Veterinary Medicine**, v. 8, p. 123–130, 2010.

JOHNSON, M. A.; TYACK, S. G.; PRIDEAUX, C.; KONGSUWAN, K.; SHEPPARD, M. Nucleotide sequence of infectious laryngotracheitis virus (gallid herpesvirus 1) ICP4 gene. **Virus Research**, v. 35, p. 193–204, 1995.

JOHNSON, M. A.; VAGNOZZI, A.; DOREA, F.; RIBLET, S. M.; MUNDT, A.; ZAVALA, G.; GARCÍA, M. Protection against infectious laryngotracheitis by in ovo vaccination with commercially available viral vector recombinant vaccines, **Avian Diseases**, v. 54, p. 1251–1259, 2010.

LEE, S. W.; DEVLIN, J. M.; MARKHAM, J. F.; NOORMAHAMMADI, A. H.; BROWNING, G. F.; FICORILLI, N. P.; HARTLEY, C. A.; MARKHAM, P. F. Phylogenetic and Molecular Epidemiological Studies Reveal Evidence of Multiple Past Recombination Events between Infectious Laryngotracheitis Viruses. **PloS ONE**, v. 8, n. 2, p. 55121, 2013.

LUCIANO, R. L.; BUIM, M. R.; DEL FAVA, C.; IKUNO, A. A.; HARAKAVA, R.; ISHIZUCA, M. M.; BUCHALA, F. G.; FERREIRA, A. J. P.; SOARES, N. M. Detecção e caracterização do vírus de laringotraqueíte infecciosa em um surto em aves de postura no estado de São Paulo, Brasil. *Revista de Educacao Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 9, n. 3, p. 41, 2011.

OLDONI, I.; GARCÍA, M. Characterization of infectious laryngotracheitis virus isolates from the US by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism of multiple genome regions. **Avian Pathology**, v. 36, p. 167–176, 2007.

PARRA, S. H. S. NUÑEZ, L. F. N.; ASTOLFI-FERREIRA, C. S., FERREIRA, A. J. P. Ocorrência de Infectious Laryngotracheitis Virus (Iltv) in 2009-2013 in the State of São Paulo – Brazil. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 17, p. 117–120, 2015.

PARRA, S. H. S.; NUÑEZ, L. F. N.; ASTOLFI-FERREIRA, C. S.; FERREIRA, A. J. P. Persistence of the tissue culture origin vaccine for infectious laryngotracheitis virus in commercial chicken flocks in Brazil. **Poultry Science**, v. 17, p. 2608–2615, 2015.

PREIS, I. S.; BRAGA, J. F. V.; COUTO, R. M.; BRASIL, B. S. A. F., MARTINS, N. R. S.; ECCO, R. Outbreak of infectious laryngotracheitis in large multi-age egg layer chicken flocks in Minas Gerais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, p. 591–596, 2013.

RODRÍGUEZ AVILA, A.; OLDONI, I.; RIBLET, S.; GARCÍA, M. Replication and Transmission of Live Attenuated Infectious Laryngotracheitis Virus (ILTV) Vaccines. **Avian Diseases**, v. 51, n. 4, p. 905–911, 2007.

SAMBERG, Y.; CUPERSTEIN, E.; BENDHEIM, U.; ARONOVICI, I. The development of a vaccine against avian infectious laryngotracheitis. IV. Immunization of chickens with a modified laryngotracheitis vaccine in the drinking water. **Avian Diseases**, v. 15, n. 2, p. 413–417, 1971.

TAMURA, A.; 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, p. 2731–2739, 2011.

VAGNOZZI, A.; ZAVALA, G.; RIBLET, S. M.; MUNDT, A.; GARCÍA, M. Protection induced by commercially available live-attenuated and recombinant viral vector vaccines against infectious laryngotracheitis virus in broiler chickens. **Avian Pathology**, v. 41, n. 1, p. 21–31, 2012.

WANASAWAENG, W.; CHANSIRIPORNCHAI, N. Molecular classification of infectious laryngotracheitis virus from chick embryo origin vaccine , tissue culture origin vaccine and field isolates. **Thai Journal Veterinary Medicine**, v. 40, n. 4, p. 393–398, 2010.

WANG, L. G.; MA, J.; XUE, C.Y.; WANG, W.; GUO, C.; CHEN, F.; QIN, J. P.; HUANG, N. H.; BI, Y. Z.; CAO, Y. C. Dynamic distribution and tissue tropism of infectious laryngotracheitis virus in experimentally infected chickens. **Archives of Virology**, v. 158, n. 3, p. 659–66, 2013.

WILLIAMS, R. A.; BENNETT, M.; BRADBURY, J. M.; GASKELL, R.M.; JONES, R. C.; JORDAN, F. T. W. Demonstration of sites of latency of infectious laryngotracheitis virus using the polymerase chain reaction. **Journal of General Virology**, v. 73, p. 2415–2420, 1992.

4 DESENVOLVIMENTO DE UMA REAÇÃO EM TEMPO REAL PARA A DETECÇÃO DO VÍRUS DA LARINGOTRAQUEÍTE INFECCIOSA (VLTÍ)

4.1 INTRODUÇÃO

A Laringotraqueíte infecciosa (LTI) é uma doença que afeta a indústria avícola mundial e ataca principalmente o trato respiratório das aves (GARCIA et al., 2014). A doença é causada por um herpesvírus que pertence à família *Herpesviridae*. É comum em áreas com alta densidade de aves, provocando grandes perdas econômicas porque pode provocar morbidade e mortalidade de moderada a alta e diminuição na produção de ovos. Os principais sinais clínicos da doença são dificuldade respiratória, tosse, espirros, conjuntivite e corrimento nasal (CALLISON et al., 2007; DAVISON et al., 2009).

Apesar das estirpes do vírus da LTI (VLTÍ) serem homogêneas antigenicamente (BAUER et al., 1999), variam na virulência, existindo cepas de baixa virulência que dão origem a infecções leves ou inaparentes, enquanto aquelas de alta virulência produzem alta morbidade e mortalidade (GUY; GARCIA, 2008). Tanto as cepas vacinais quanto as de campo podem causar uma infecção latente que é caracterizada por períodos de latência, intercalada com episódios espontâneos de disseminação do vírus e aparecimento da doença, geralmente, causados por fatores estressantes (BAGUST, 1986; HUGHES et al., 1989; WILLIAMS et al., 1992).

Nos últimos anos o diagnóstico do VLTÍ foi realizado por várias técnicas como: histopatologia, imunofluorescência (IF), imunoperoxidase (IP), RFLP, reação em cadeia pela polimerase (PCR), PCR em tempo real (GARCIA; SPATZ; GUY, 2014). Os ensaios realizados com o PCR convencional ou de ponto final foram utilizados para se detectar o DNA viral na traqueia de animais infectados experimentalmente (ABBAS; JAMES; ANDREASEN, 1996) ou infectadas naturalmente; também foram detectados nas amostras de conjuntiva e do gânglio trigêmeo (WILLIAMS; SAVAGE; JONES, 1994; CHACON; FERREIRA, 2008). Além disso, esta técnica também foi útil na detecção da doença clínica e subclínica (SELLERS et al., 2004; CHACON; FERREIRA, 2008).

Os ensaios de PCR em tempo real têm uma ampla aceitação em comparação com o PCR convencional devido a rapidez, sensibilidade, reprodutibilidade, risco reduzido de contaminação e pela capacidade de quantificar o ácido nucleico viral diretamente de amostras de ensaios experimentais ou amostras clínicas (MACKAY; ARDEN; NITSCHKE, 2002).

No presente estudo um ensaio do agente intercalante de dupla fita de DNA SYBER® FAST PCR foi usado para a padronização de uma reação em tempo real para a detecção do VLT1 em amostras clínicas com suspeita de LTI.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Amostras virais

No presente estudo foram utilizadas 165 amostras estocadas, no período de 2009 a 2016, no acervo do Laboratório de Ornitopatologia (LABOR), provenientes de diferentes regiões do Brasil, de aves com problemas respiratórios e com suspeita clínica da doença (Quadro 3).

Quadro 3 - Identificação das amostras

(Continua)

ID da amostra	Órgão	Ano
330-2	Trigêmeo	2009
339-42	Traqueia e conjuntiva	2009
339-82	Traqueia e conjuntiva	2009
344-4	Trigêmeo	2009
344-9	Traqueia e conjuntiva	2009
344-10	Trigêmeo	2009
344-14	Trigêmeo	2009
355-7	Traqueia e conjuntiva	2009
360-27	Traqueia e conjuntiva	2009
360-33	Traqueia e conjuntiva	2009

(Continuação)

ID da amostra	Órgão	Ano
360-34	Trigêmeo	2009
360-37	Traqueia e conjuntiva	2009
360-38	Trigêmeo	2009
360-39	Traqueia e conjuntiva	2009
360-40	Trigêmeo	2009
360-46	Trigêmeo	2009
367-13	Traqueia e conjuntiva	2009
373-3	Traqueia e conjuntiva	2009
373-4	Trigêmeo	2009
373-9	Traqueia e conjuntiva	2009
373-11	Traqueia e conjuntiva	2009
373-17	Traqueia e conjuntiva	2009
373-17 T	Trigêmeo	2009
373-18	Trigêmeo	2009
377-16	Traqueia e conjuntiva	2009
377-17	Trigêmeo	2009
381-1	Traqueia e conjuntiva	2010
381-3	Traqueia e conjuntiva	2010
381-5	Traqueia e conjuntiva	2010
381-9	Traqueia e conjuntiva	2010
389-13	Traqueia e conjuntiva	2010
389-15	Traqueia e conjuntiva	2010
402-1	Traqueia e conjuntiva	2010
402-2	Trigêmeo	2010
402-8	Trigêmeo	2010
402-10	Trigêmeo	2010
402-11	Traqueia e conjuntiva	2010
402-15	Traqueia e conjuntiva	2010
402-19	Traqueia e conjuntiva	2010
402-25	Traqueia e conjuntiva	2010
402-35	Traqueia e conjuntiva	2010
402-38	Trigêmeo	2010
402-39	Traqueia e conjuntiva	2010
402-43	Traqueia e conjuntiva	2010

(Continuação)

ID da amostra	Órgão	Ano
402-44	Trigêmeo	2010
404-5	Traqueia e conjuntiva	2010
404-29	Traqueia e conjuntiva	2010
409-2	Trigêmeo	2010
409-7	Traqueia e conjuntiva	2010
409-9	Traqueia e conjuntiva	2010
409-11	Traqueia e conjuntiva	2010
409-14	Traqueia e conjuntiva	2010
413-5	Traqueia e conjuntiva	2010
413-9	Traqueia e conjuntiva	2010
417-1	Traqueia e conjuntiva	2011
417-5	Traqueia e conjuntiva	2011
417-13	Traqueia e conjuntiva	2011
417-19	Traqueia e conjuntiva	2011
417-20	Trigêmeo	2011
417-24	Trigêmeo	2011
417-25	Traqueia e conjuntiva	2011
417-26	Trigêmeo	2011
428-1	Trigêmeo	2011
428-2	Traqueia e conjuntiva	2011
512-1	Rim	2013
512-2	Pulmão	2013
512-3	Traqueia e conjuntiva	2013
512-5	Rim	2013
512-6	Pulmão	2013
512-7	Traqueia	2013
514-1	Traqueia	2013
514-2	Intestino	2013
514-4	Rim	2013
514-5	Pulmão	2013
514-7	Intestino	2013
514-8	Traqueia	2013
514-9	Pulmão	2013
514-10	Rim	2013
514-11	Intestino	2013

(Continuação)

ID da amostra	Órgão	Ano
514-12	Rim	2013
514-13	Traqueia	2013
514-15	Pulmão	2013
514-16	Traqueia	2013
514-17	Tonsila	2013
514-18	Pulmão	2013
514-19	Rim	2013
514-20	Intestino	2013
518-1	Baço	2013
518-2	Rim	2013
518-3	Intestino	2013
518-4	Intestino	2013
518-5	Fígado	2013
518-6	Fígado	2013
518-7	Baço	2013
518-8	Rim	2013
518-9	Intestino	2013
518-10	Pâncreas	2013
526-1	Traqueia	2013
526-2	Pulmão	2013
526-4	Traqueia	2013
526-5	Traqueia	2013
526-8	Tonsila	2013
550-1	Tonsila	2014
550-2	Rim	2014
550-3	Pulmão	2014
550-4	Traqueia	2014
550-5	Pálpebra	2014
550-6	Tonsila	2014
550-7	Rim	2014
550-8	Pulmão	2014
550-9	Traqueia	2014
550-10	Pálpebra	2014
551-1	Rim	2014
551-2	Saco aéreo	2014

(Continuação)

ID da amostra	Órgão	Ano
551-3	Pálpebra	2014
551-4	Tonsila	2014
551-5	Pulmão	2014
551-6	Traqueia	2014
584-1	Traqueia	2014
584-2	Pálpebra	2014
584-3	Pulmão	2014
584-4	Tonsila	2014
584-5	Traqueia	2014
584-6	Pálpebra	2014
584-7	Pulmão	2014
589-1	Traqueia e conjuntiva	2014
589-2	Trigêmeo	2014
589-3	Traqueia e conjuntiva	2014
589-4	Trigêmeo	2014
589-5	Traqueia e conjuntiva	2014
589-6	Trigêmeo	2014
589-7	Traqueia e conjuntiva	2014
589-8	Trigêmeo	2014
607-1	Traqueia	2015
607-2	Pulmão	2015
607-3	Rim	2015
607-4	Tonsila	2015
657-1	Tonsila	2015
657-2	Rim	2015
657-3	Traqueia	2015
657-4P	Pálpebra	2015
657-4T	Trigêmeo	2015
657-5	Tonsila	2015
657-6	Rim	2015
657-7	Traqueia	2015
657-8	Pálpebra	2015
657-8 Trig	Trigêmeo	2015
674-1	Traqueia	2016
674-2	Pálpebra	2016

(Conclusão)

ID da amostra	Órgão	Ano
674-3	Intestino	2016
674-4	Rim	2016
674-5	Tonsila	2016
675-1	Traqueia	2016
675-2	Pálpebra	2016
675-3	Intestino	2016
675-4	Rim	2016
675-5	Tonsila	2016
695-1	Traqueia	2016
695-2	Pálpebra	2016
695-3	Trigêmeo	2016
714-1	Traqueia	2016
714-2	Tonsila	2016
714-3	Pulmão	2016
729-1	Traqueia	2016

Fonte: (SANTANDER-PARRA, S. H., 2016)

4.2.2 Suspensão viral

Uma alíquota das amostras, previamente maceradas, foi colocada em um microtubo contendo tampão fosfato salino (PBS) 0,1M, 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 20 minutos a 4°C e se obteve 200 μL do sobrenadante para a extração do DNA.

4.2.3 Extração do DNA viral das amostras

O DNA viral das amostras ou da vacina para LTI foi extraído segundo o protocolo descrito por Chomczynski (1993), como controle negativo da reação foi usado o PBS 0,1M pH 7,4. O DNA foi suspenso em 30µL de tampão Tris-EDTA (TE) e armazenado a -20°C para a realização dos testes moleculares.

4.2.4 PCR e *Nested* PCR para a detecção do VLTI

As amostras foram testadas de acordo com o protocolo utilizado no laboratório de Ornitopatologia (LABOR) quando existe a solicitação do teste para o VLTI, sendo realizada a reação descrita por CHACON; FERREIRA (2008). Na reação de PCR foram utilizados 22,5 µL 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 MgCl₂ e 1,0 U de Taq DNA polimerase Platinum (Invitrogen by Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) e 2,5 µL de DNA. A reação de amplificação ocorreu nas seguintes condições: um ciclo térmico de 94°C por 3 minutos, 45 ciclos de temperaturas de 94°C por um minuto, 58°C por 30 segundos, 72°C por 45 segundos, seguida de 72°C por 10 minutos. A segunda amplificação (*Nested*-PCR) foi realizada de maneira semelhante, exceto que a amostra de DNA foi substituída por 2,5 µL do produto do PCR e os *primers* utilizados foram GE 3S e GE 4AS. As sequências dos *primers*, os tamanhos dos produtos amplificados e as referências se encontram no quadro 4.

Uma alíquota de 10 µL do produto do *Nested*-PCR foi 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 *Alpha Imager Mini Análises System* (Alpha InnotechCorp., San Leandro, CA).

4.2.5 Desenvolvimento de uma reação de PCR em Tempo real (qPCR) para a detecção e quantificação de um fragmento do gene que codifica a glicoproteína E (gE) do VLTI

Para o desenvolvimento de uma reação de qPCR para a LTI foi necessário se realizar a reação de PCR de ponto final que foi descrita no item 4.2.4. O produto gerado após a amplificação foi inserido no vetor PcrTM 2.1-TOPO (Invitrogen by Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), e células competentes *E. coli* TOP 10 foram transformadas e clonadas de acordo com as instruções do fabricante. O produto amplificado para o gene que codifica a gE possuía 540 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 do plasmídeo obtido foi submetido a uma reação de PCR de ponto final com os *primers* e condições da reação descritas no item 4.2.4 para se amplificar o fragmento do gene que foi inserido.

O produto obtido foi purificado usando o *kit GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) seguindo as recomendações do fabricante. O 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). Com as sequências obtidas foram desenhados *primers* específicos com o programa *CLC Main Workbench 7.0.1* (Quadro 4).

Quadro 4 - *Primers* usados para a amplificação do gene que codifica a gE

Primer	Sequência	Reação	Tamanho	Referencia
GE 1S	CGTATACCATCCTACAGACGGCA	PCR de ponto final	540 pb	CHACON; FERREIRA, 2008
GE 2AS	CGTACAATGGTTCGGTCTTGGA			
GE 3S	AGTCCTCTTATAGCCATCCCCA	PCR de ponto final	219 pb	
GE 4AS	CACCCCCGCGACGACGAAGT			
GLIC-E F	ACGCACATGCCCTCGAA	qPCR	56 pb	Este estudo
GLIC-E R	GGTCCGGGACTGCCAATTA			

Fonte: (SANTANDER-PARRA, S. H., 2016)

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

A reação de qPCR 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 um 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 *Step One Plus System* (*Applied Biosystems*), no modo *fast*. As condições de temperatura e ciclos utilizados foram 95°C por 15 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 30 segundos.

4.2.7 Determinação da sensibilidade e da curva padrão do qPCR

Para a determinação da sensibilidade do ensaio, o DNA plasmídeo 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* (*THERMOFISHER, 2016*) foi determinada a relação entre o número e a massa do plasmídeo, para que

uma diluição com concentração inicial de 1^{10} 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 10 cópias de plasmídeo a 1.000.000 de cópias de plasmídeo. Foram determinados os limites de detecção onde a amplificação foi positiva. A eficiência da PCR também foi determinada com as diluições seriadas.

As amostras descritas no Quadro 3 foram testadas com o protocolo de qPCR para o agente intercalante de dupla fita de DNA *Fast SYBR® GREEN* desenvolvido.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Caracterização molecular (PCR convencional)

Das 164 amostras estudadas um total de 74 (45,12%) amostras foram positivas para o gene que codifica a gE, pois apresentaram um produto amplificado de um tamanho aproximado de 219 pb (Quadro 5).

4.3.2 Desenvolvimento de uma reação de PCR em Tempo real (qPCR) para a detecção e quantificação de um fragmento do gene que codifica a glicoproteína E (gE) do VLTI

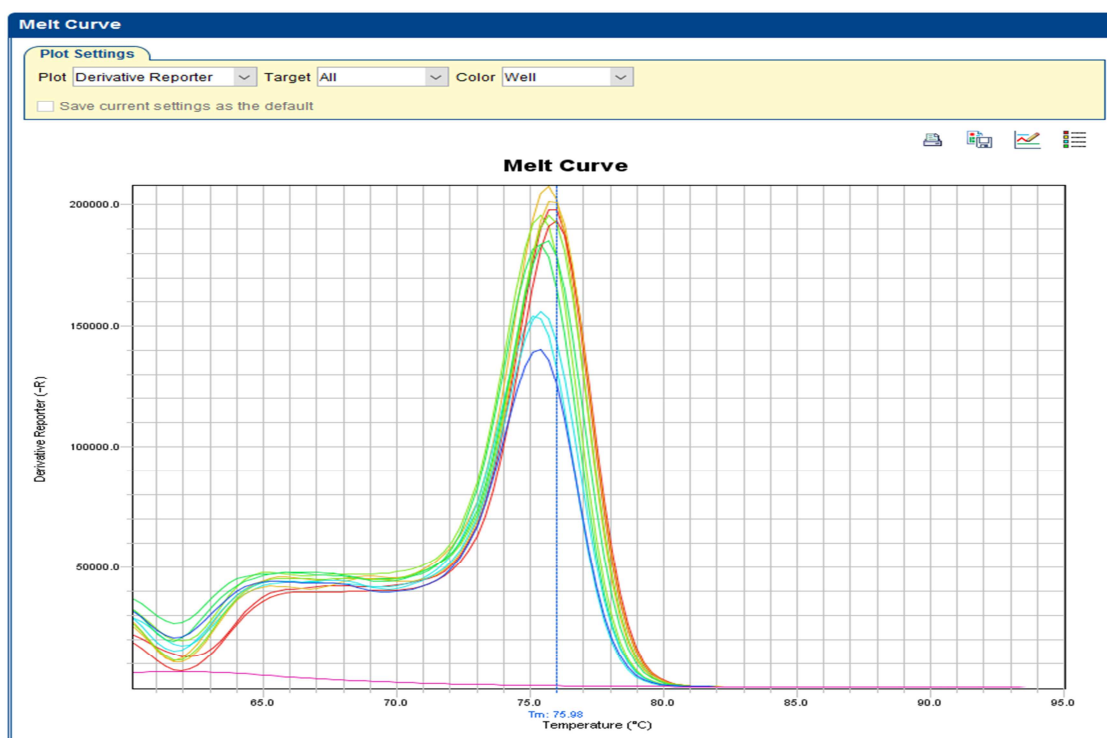
A qPCR para a detecção e quantificação de um fragmento do gene que codifica a gE do VLTI amplificou um fragmento de 56 pb. O limite de detecção (LOD - *Limit of Detection*) foi de uma (01) cópia de plasmídeo e o limite de quantificação (LOQ - *Limit of quantification*) era de cinco (05) cópias de plasmídeo. Cada cópia equivale a uma partícula viral, mostrando uma curva com uma eficiência de 100,17% com um *slope* de -3,318 e $R^2=0,983$. 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 75,98°C, sem a presença de produtos inespecíficos como os dímeros. Estes resultados se encontram nas Figuras 4, 5, 6.

As curvas só foram detectadas na presença do VLTI e nenhuma sinal foi detectado no controle negativo.

Do total de amostras (164), cento e trinta e três (133) amostras foram positivas para o VLTI através da reação de qPCR. Estes resultados se encontram descritos no quadro 5 e 6.

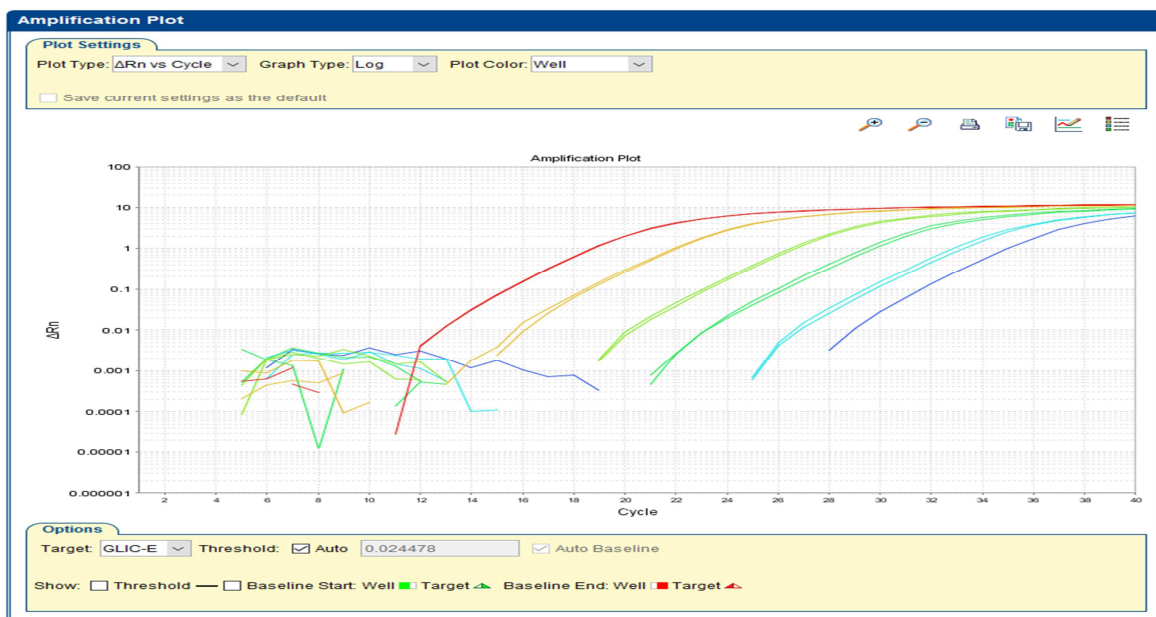
Figura 4 - Padronização da qPCR para a gE do VLTI



Fonte: (SANTANDER-PARRA, S. H., 2016)

Legenda: Curva de *melting* gerada no desenvolvimento da reação de qPCR para a detecção e quantificação do gene da gE do VLTI.

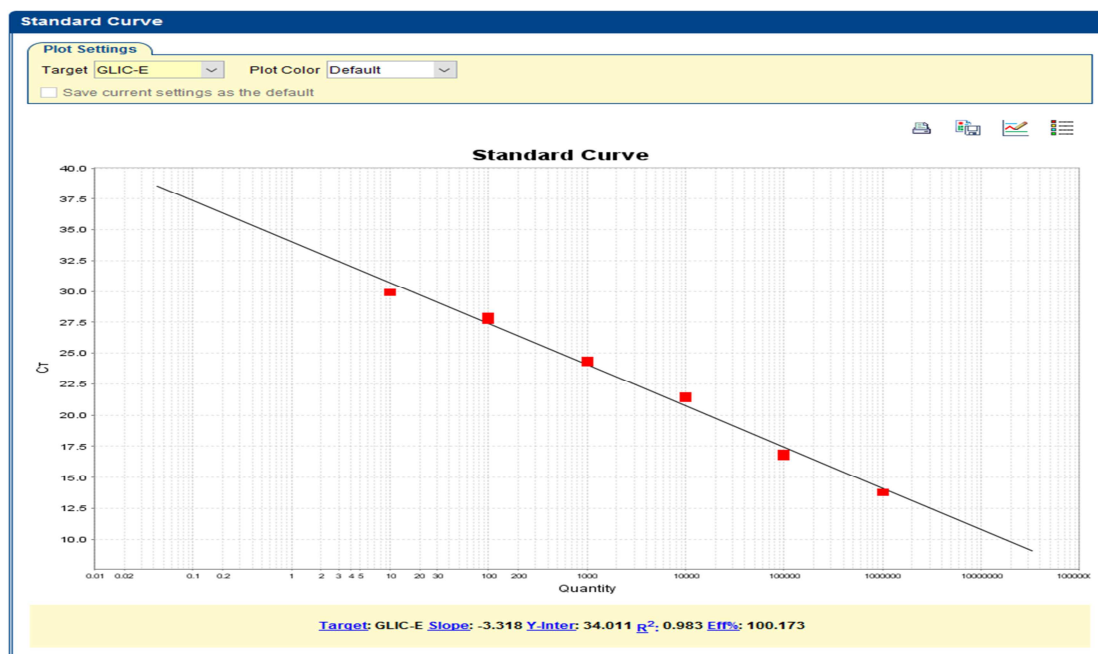
Figura 5 - Padronização da qPCR para a gE do VLT1



Fonte: (SANTANDER-PARRA, S. H., 2016)

Legenda: Gráfico de amplificação gerado no desenvolvimento da reação de qPCR para a detecção e quantificação do gene da gE do VLT1.

Figura 6 - Padronização da qPCR para a gE do VLT1.



Fonte: (SANTANDER-PARRA, S. H., 2016)

Legenda: Curva de eficiência gerada no desenvolvimento da reação de qPCR para a detecção e quantificação do gene da gE do VLT1.

Quadro 5 – Resultados do PCR convencional e do qPCR das amostras analisadas

(Continua)

N.	Identificação da Amostra	Nested- PCR - gE	qPCR – gE	
		Detecção Viral	Detecção Viral	Quantificação Viral
1	330-2	+	+	NQ
2	339-42	+	+	NQ
3	339-82	+	+	NQ
4	344-4	+	+	NQ
5	344-9	+	+	NQ
6	344-10	+	+	NQ
7	344-14	+	+	NQ
8	355-7	+	+	NQ
9	360-27	+	+	5722777
10	360-33	-	-	-
11	360-34	+	+	650,45
12	360-37	+	+	18,56
13	360-38	-	+	24,77
14	360-39	+	+	5,55
15	360-40	-	+	NQ
16	360-46	-	+	168,43
17	367-13	+	+	162,89
18	373-3	-	+	52,06
19	373-4	+	+	NQ
20	373-9	-	+	NQ
21	373-11	-	+	23,10
22	373-17	+	+	NQ
23	373-17 T	+	+	5,08
24	373-18	-	+	143,25
25	377-16	+	+	NQ
26	377-17	+	+	1149684,54
27	381-1	+	+	203,92
28	381-3	+	+	100,35
29	381-5	+	+	488,38
30	381-9	+	+	60,79
31	389-13	+	+	NQ
32	389-15	+	+	NQ
33	402-1	+	+	73,34
34	402-2	-	+	NQ

(Continuação)

N.	Identificação da Amostra	Nested- PCR - gE	qPCR – gE	
		Detecção Viral	Detecção Viral	Quantificação Viral
35	402-8	-	+	211,63
36	402-10	-	+	11,56
37	402-11	+	+	NQ
38	402-15	-	+	NQ
39	402-19	-	+	NQ
40	402-25	+	+	47,45
41	402-35	-	+	NQ
42	402-38	-	+	13,13
43	402-39	+	+	122,22
44	402-43	-	+	NQ
45	402-44	-	+	202,53
46	404-5	+	+	12,18
47	404-29	+	+	17,59
48	409-2	+	+	5,81
49	409-7	+	+	66,57
50	409-9	+	+	36,84
51	409-11	+	+	20,42
52	409-14	+	+	23,15
53	413-5	+	+	NQ
54	413-9	+	+	18,80
55	417-1	+	+	NQ
56	417-5	+	+	NQ
57	417-13	+	+	262,96
58	417-19	+	+	NQ
59	417-20	+	+	NQ
60	417-24	+	+	NQ
61	417-25	+	+	8299,91
62	417-26	+	+	NQ
63	428-1	+	+	40,37
64	428-2	+	+	239248,54
65	512-1	+	+	10,21
66	512-2	+	+	NQ
67	512-3	-	+	NQ
68	512-5	-	+	NQ
69	512-6	-	+	NQ

(Continuação)

N.	Identificação da Amostra	Nested- PCR - gE	qPCR – gE	
		Detecção Viral	Detecção Viral	Quantificação Viral
70	512-7	-	+	NQ
71	514-1	-	-	-
72	514-2	-	+	NQ
73	514-4	-	+	NQ
74	514-5	-	+	NQ
75	514-7	-	-	-
76	514-8	-	+	NQ
77	514-9	-	-	-
78	514-10	-	-	-
79	514-11	-	-	-
80	514-12	-	+	NQ
81	514-13	-	-	-
82	514-15	-	+	NQ
83	514-16	+	+	232,27
84	514-17	+	+	18,46
85	514-18	-	-	-
86	514-19	-	-	-
87	514-20	-	-	-
88	518-1	-	-	-
89	518-2	-	-	-
90	518-3	-	-	-
91	518-4	+	+	27,92
92	518-5	-	-	-
93	518-6	-	-	-
94	518-7	-	-	-
95	518-8	-	+	NQ
96	518-9	-	+	NQ
97	518-10	-	-	-
98	526-1	-	-	-
99	526-2	-	+	NQ
100	526-4	-	+	NQ
101	526-5	-	-	-
102	526-8	-	+	NQ
103	550-1	-	+	75,94
104	550-2	-	+	71,42

(Continuação)

N.	Identificação da Amostra	Nested- PCR - gE	qPCR – gE	
		Deteccção Viral	Deteccção Viral	Quantificação Viral
105	550-3	-	+	68,30
106	550-4	+	+	71,88
107	550-5	+	+	NQ
108	550-6	-	-	-
109	550-7	-	+	NQ
110	550-8	-	+	71,189
111	550-9		+	70,759
112	550-10	-	-	-
113	551-1	-	-	-
114	551-2	-	+	65,62
115	551-3	-	+	73,56
116	551-4	-	+	NQ
117	551-5	-	-	-
118	551-6	+	+	69,17
119	584-1	-	-	-
120	584-2	-	-	-
121	584-3	-	-	-
122	584-4	+	-	-
123	584-5	-	-	-
124	584-6	-	-	-
125	584-7	-	+	68
126	589-1	-	+	71,63
127	589-2	-	+	65,73
128	589-3	+	+	NQ
129	589-4	-	+	70,58
130	589-5	-	+	74,02
131	589-6	-	-	-
132	589-7	-	+	87,25
133	589-8	-	+	72,06
134	607-1	+	+	NQ
135	607-2	-	+	65,12
136	607-3	-	+	67,38
137	607-4	+	+	145,86
138	657-1	-	+	71,83
139	657-2	-	+	NQ

(Conclusão)

N.	Identificação da Amostra	Nested- PCR - gE	qPCR – gE	
		Detecção Viral	Detecção Viral	Quantificação Viral
140	657-3	+	+	13993,48
141	657-4P	+	+	620624,53
142	657-4T	+	+	181,55
143	657-5	+	+	808,06
144	657-6	-	+	NQ
145	657-7	+	+	8223,63
146	657-8	-	+	5,55
147	657-8 Trig	-	+	NQ
148	674-1	-	+	NQ
149	674-2	-	+	NQ
150	674-3	-	+	NQ
151	674-4	+	+	NQ
152	674-5	-	+	NQ
153	675-1	-	+	NQ
154	675-2	+	+	NQ
155	675-3	-	+	NQ
156	675-4	-	+	NQ
157	675-5	-	+	NQ
158	695-1	+	+	500526,06
159	695-2	+	+	172460,95
160	695-3	+	+	29,33
161	714-1	+	+	565,65
162	714-2	-	+	NQ
163	714-3	+	+	NQ
164	729-1	+	+	136008,06

Fonte: (SANTANDER-PARRA, S. H., 2016)

Legenda: +: positivo

-: negativo

NQ: não quantificado (amostras onde o VLTI foi detectado, mas, não quantificado porque se encontravam com menos de cinco partículas virais que corresponde ao LOQ do ensaio)

Quadro 6 - Número e Porcentagens de amostras positivas e negativas usando o *Nested*-PCR e o qPCR

Tipo de Amostra	Número de Amostras Analisadas	<i>Nested</i> /PCR				qPCR			
		Amostras Positivas	%	Amostras Negativas	%	Amostras Positivas	%	Amostras Negativas	%
C + T	47	35	21,3	12	7,3	46	28,0	1	0,6
Traqueia	21	9	5,5	12	7,3	15	9,1	6	3,7
Pulmão	14	2	1,2	12	7,3	10	6,1	4	2,4
Trigêmeo	28	16	9,8	12	7,3	27	16,5	1	0,6
Tonsila Cecal	13	5	3,0	8	4,9	11	6,7	2	1,2
Rim	16	2	1,2	14	8,5	12	7,3	4	2,4
Saco Aéreo	1	-	-	1	0,6	-	-	1	0,6
Fígado	2	-	-	2	1,2	-	-	2	1,2
Intestino	9	1	0,6	8	4,9	5	3,0	4	2,4
Pâncreas	1	-	-	1	0,6	0	0,0	1	0,6
Pálpebra	10	4	2,4	6	3,7	7	4,3	3	1,8
Baço	2	-	-	2	1,2	-	-	2	1,2
Total Amostras	164	74	45,12	90,00	54,88	133	81,1	31	18,9

Fonte: (SANTANDER-PARRA, S. H., 2016)

Legenda: C+T: pool de conjuntiva mais traqueia

4.4 DISCUSSÃO

A LTI é uma doença infecciosa altamente contagiosa que causa grandes perdas na indústria avícola ao redor do mundo, sendo assim, a rápida detecção do vírus é sumamente importante para evitar a propagação do vírus.

O diagnóstico do VLTI com base em sintomas clínicos é um tanto difícil porque existem diversas manifestações clínicas da doença fazendo com que o diagnóstico diferencial seja muito importante (CHACON; FERREIRA, 2008). Além disso, o vírus da LTI pode causar infecções latentes, ou seja, estes vírus continuam apresentando a capacidade de causar doença tanto quanto os vírus selvagens que estão circulando no ambiente (WILLIAMS et al., 1992). Dessa forma, o desenvolvimento de métodos para o diagnóstico de infecções clínicas como latentes são muito importantes.

Diversas técnicas de PCR em tempo real, foram desenvolvidas para a detecção do VLTI (CREELAN et al., 2006; CALLISON et al., 2007; ROY et al., 2015)

tornando-se uma técnica de grande importância devido a sua simplicidade, rapidez, reprodutibilidade e elevada sensibilidade em comparação com os outros métodos diagnósticos (ZHAO et al., 2013).

A glicoproteína E é uma proteína essencial para o vírus, é importante na expressão da virulência dos herpesvírus como o vírus da Pseudorína (VPR) e do herpesvírus felino, participando na disseminação célula-célula e na liberação viral (METTENLEITER, 1991). Além de que o gene desta glicoproteína possui regiões altamente conservadas (HUMBERD, et al., 2002).

Este estudo desenvolveu e validou uma reação de PCR em tempo real (qPCR), orientada ao gene que codifica a gE, baseada no agente intercalante de dupla fita de DNA, *SYBER® GREEN FAST*, para a detecção do VLTI em amostras clínicas de aves com presença de problemas respiratórios. O diagnóstico inicial foi realizado através de um *Nested-PCR* que tem a capacidade de detectar o VLTI de amostras clínicas de aves com infecções clínicas, com infecções latentes causadas por amostras de vacinas ou vírus selvagens (CHACON; FERREIRA, 2008). Como o PCR em tempo real tem a capacidade de detectar o vírus em amostras clínicas, é um método mais rápido do que o PCR convencional (CREELAN et al., 2006; CALLISON et al., 2007) estas características tornam esta reação muito importante, porque determinadas situações exigem um diagnóstico rápido e seguro, como por exemplo quando existe um surto, pois um diagnóstico rápido da presença do vírus vai ajudar nas estratégias a serem empregadas para o controle da doença.

A sensibilidade na detecção do vírus é fundamental na avaliação do progresso da infecção e no controle da sua propagação (MAHMOUDIAN et al., 2011). Dessa forma, neste estudo o qPCR do agente intercalante de dupla fita de DNA, *SYBER® GREEN FAST* mostrou uma alta sensibilidade ao detectar apenas uma cópia de plasmídeo, equivalente a uma partícula viral. Estes resultados são distintos daqueles encontrados em outros estudos onde o limite de detecção foi de 100 cópias (CREELAN et al., 2006) e de 140 cópias do amplificado (CALLISON et al., 2007).

Na maioria dos estudos realizados para a detecção do VLTI por qPCR, a tecnologia utilizada foi o *Taqman*, sendo necessária a presença de uma sonda para o seu desenvolvimento (CALLISON et al., 2007; ZHAO et al., 2013; ROY et al., 2015), o que torna a reação com um custo maior. Poucos estudos usam a tecnologia do agente intercalante de dupla fita de DNA, *SYBER® GREEN* (CREELAN, et al.,

2006; MAHMOUDIAN et al., 2011), esta tecnologia também foi utilizada no diagnóstico de outros herpesvírus, demonstrando a sua sensibilidade e rapidez no diagnóstico da doença (NICOLL; BRASS; CUBIE, 2001).

A curva padrão utilizada no ensaio descrito por MAHMOUDIAN et al., (2011) para o gene UL15a, apresentou uma eficiência global de 96,36% e um coeficiente de determinação (R^2) de 0,994, o ensaio padronizado neste estudo mostrou uma eficiência de 100,173% e um valor de R^2 de 0,983, mostrando a confiabilidade dos ensaios realizados e garantindo que os valores absolutos da quantificação viral são muito confiáveis.

O estudo demonstrou também que o qPCR conseguiu detectar amostras que foram negativas no *Nested-PCR*, porém, em algumas destas amostras não conseguiu quantificar já que existia menos que cinco partículas virais. Dessa forma este procedimento seria de grande ajuda no diagnóstico do VLTI.

4.5 CONCLUSÃO

Este estudo indicou que a utilização do qPCR do agente intercalante de dupla fita de DNA, *SYBER® GREEN FAST*, em vez da utilização do PCR convencional em um laboratório de diagnóstico traz algumas vantagens como: o tempo de processamento é menor, elimina a necessidade de processamento pós amplificação; os custos de processamento são menores porque as quantidades dos reagentes são pequenas e não se utilizam reagentes adicionais (dNTPs, $MgCl_2$, assim como outros como a agarose) que aumentam o custo das reações e além da detecção viral ser rápida, e detecta o vírus em amostras onde existe uma baixa concentração do vírus.

Todos estes aspectos são importantes em um laboratório de diagnóstico já que a rapidez do diagnóstico ajuda nas decisões a serem tomadas para dar início a terapia apropriada para o controle da doença, (NICOLL; BRASS; CUBIE, 2001). Assim, o desenvolvimento da tecnologia de qPCR *SYBR®-FAST* mostrada neste estudo pode ser usada em um laboratório de diagnóstico por ser um teste específico e reprodutível.

REFERÊNCIAS

ABBAS, F.; JAMES, R.; ANDREASEN, J. Comparison of diagnostic tests for infectious laryngotracheitis. **Avian Diseases**, v. 40, n. 2, p. 290–295, 1996.

BAGUST, T. J. Laryngotracheitis (Gallid-1) herpesvirus infection in the chicken. 4. Latency establishment by wild and vaccine strains of ILT virus. **Avian Pathology**, v. 15, n. 3, p. 581–95, 1986.

BAUER, B.; LOHR, J. E.; KALETA, E. F. Comparison of commercial ELISA test kits from Australia and the USA with the serum neutralization test in cell cultures for the detection of antibodies to the infectious laryngotracheitis virus of chickens. **Avian Pathology**, v. 28, p. 65–72, 1999.

CALLISON, S. A.; RIBLET, S. M.; OLDONI, I.; SUN, S.; ZAVALA, G.; WILLIAMS, S.; RESURRECCION, R.S.; SPACKMAN, E.; GARCIA, M. Development and validation of a real-time Taqman PCR assay for the detection and quantitation of infectious laryngotracheitis virus in poultry. **Journal of Virological Methods**, v. 139, n. 1, p. 31–38, 2007.

CHACON, J. L.; FERREIRA, A. J. P. Development and validation of nested-PCR for the diagnosis of clinical and subclinical infectious laryngotracheitis. **Journal of Virological Methods**, v. 151, p. 188–93, 2008.

CHOMCZYNSKI, P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and protein for the cell and tissues samples. **Biotechniques**, v. 15, p. 532–536, 1993.

COPPO, M. J. C.; NOORMOHAMMADI, A. H.; BROWNING, G. F.; DEVLIN, J. M. Challenges and recent advancements in infectious laryngotracheitis virus vaccines. **Avian Pathology**, v. 42, n. 3, p. 195–205, 2013.

CREELAN, J. L.; CALVERT, V. M.; GRAHAM, D. A.; McCULLOUGH, S. J. Rapid detection and characterization from field cases of infectious laryngotracheitis virus by real-time polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism. **Avian Pathology**, v. 35, n. 2, p. 173–179, 2006.

DAVISON, A. J.; EBERLE, R.; EHLERS, B.; HAYWARD, G. S.; McGEOCH, J. D.;

MINSON, A. C.; PELLETT, P. E.; ROIZMAN, B.; STUDDERT, M. J.; THIRY, E. The Order Herpesvirales. **Archives of Virology**, v. 154, n. 1, p. 171–177, 2009.

GARCIA, M.; SPATZ, S.; GUY, J. S. Infectious Laryngotracheitis. In: SAIF, Y. M. GLISSON, J. R.; FADLY, A. M.; McDOUGALD, L. R.; NOLAN, L. K.; SWAYNE, D.E (Org.). **Diseases of Poultry**. 13th. ed. [S.l.]: Iowa States Press, 2014. p. 161–179.

GUY, J. S.; GARCIA, M. Laryngotracheitis. In: SAIF, Y. M. GLISSON, J. R.; FADLY, A. M.; McDOUGALD, L. R.; NOLAN, L. K.; SWAYNE, D.E (Org.). **Diseases of Poultry**. 12th. ed. [S.l.]: Iowa States Press, 2008 p. 137–152.

HUGHES, C. S.; GASKELL, R. M.; JONES, R. C.; BRADBURY, J. M.; JORDAN, F. T. Effects of certain stress factors on the re-excretion of infectious laryngotracheitis virus from latently infected carrier birds. **Research in Veterinary Science**, v. 46, p. 274–276, 1989.

HUMBERD, J.; GARCÍA, M.; RIBLET, S. M.; RESURRECCION, R. S.; BROWN, T. P. Detection of infectious laryngotracheitis virus in formalin-fixed , paraffin-embedded tissues by nested polymerase chain reaction, **Avian Diseases**, v. 46, n. 1, p. 64–74, 2002.

LEE, S. W.; DEVLIN, J. M.; MARKHAM, J. F.; NOORMAHAMMADI, A. H.; BROWNING, G. F.; FICORILLI, N. P.; HARTLEY, C. A.; MARKHAM, P. F. Phylogenetic and molecular epidemiological studies reveal evidence of multiple past recombination events between infectious laryngotracheitis viruses. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, p. 55121, 2013.

MACKAY, I. M.; ARDEN, K. E.; NITSCHKE, A. Real-time PCR in virology. **Nucleic Acids REsearch**, v. 30, n. 6, p. 1292–1305, 2002.

MAHMOUDIAN, A.; KIRKPATRICK, N. C.; COPPO, M.; LEE, S. W.; DEVLIN, J. M.; MARKHAM, P. F.; BROWNING, G. F.; NOORMOHAMMADI, A. H. Development of a SYBR Green quantitative polymerase chain reaction assay for rapid detection and quantification of infectious laryngotracheitis virus. **Avian Pathology**, v. 40, p. 237–242, 2011.

METTENLEITER, T. C. Molecular biology of pseudorabies (Aujeszky ' s disease virus). **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 14,

n. 2, p. 151–163, 1991.

NICOLL, S.; BRASS, A.; CUBIE, H. A. Detection of herpes viruses in clinical samples using real-time PCR. **Journal of Virological Methods**, v. 96, p. 25–31, 2001.

RODRÍGUEZ AVILA, A.; OLDONI, I.; RIBLET, S.; GARCÍA, M. Replication and Transmission of Live Attenuated Infectious Laryngotracheitis Virus (ILTV) Vaccines. **Avian Diseases**, v. 51, n. 4, p. 905–911, 2007.

ROY, P.; KAKHRUL ISLAM, A. F. M.; BURGESS, S. K.; HUNT, P. W.; McNALLY, J.; WALKDEN-BROWN, S. W. Real-time PCR quantification of infectious laryngotracheitis virus in chicken tissues, faeces, isolator-dust and bedding material over 28 days following infection reveals high levels in faeces and dust. **Journal of General Virology**, v. 96, p. 3338–3347, 2015.

SELLERS, H. S.; GARCÍA, M.; GLISSON, J. R.; BROWN, T. P.; JEAN, S.; GUY, J. S. Mild Infectious Laryngotracheitis in Broilers in the Southeast. **Avian Diseases**, v. 48, n. 2, p. 430–436, 2004.

THERMOFISHER Scientific. **DNA copy number and dilution calculator**. 2016. Disponível em: <<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>>. Acesso em: 12 jun. 2016.

WILLIAMS, R. A.; BENNETT, M.; BRADBURY, J. M.; GASKELL, R. M.; JONES, R. C.; JORDAN, F. T. W. Demonstration of sites of latency of infectious laryngotracheitis virus using the polymerase chain reaction. **Journal of General Virology**, v. 73, p. 2415–2420, 1992.

WILLIAMS, R. A.; SAVAGE, C. E.; JONES, R. C. A comparison of direct electron microscopy, virus isolation and a DNA amplification method for the detection of avian infectious laryngotracheitis virus in field material. **Avian Pathology**, v. 23, p. 709–720, 1994.

ZHAO, Y.; KONG, C.; CUI, X.; CUI, H.; SHI, X.; ZHANG, X. Detection of infectious laryngotracheitis virus by real-time PCR in naturally and experimentally infected chickens. **PloS ONE**, v. 8, n. 6, p. 1–10, 2013.

5 ISOLAMENTO EM OVOS EMBRIONADOS DO VÍRUS DA LARINGOTRAQUEÍTE INFECCIOSA E A PADRONIZAÇÃO DE UM PCR EM TEMPO REAL PARA A DETECÇÃO DESTE VÍRUS PELO GENE ICP4

5.1 INTRODUÇÃO

A Laringotraqueíte infecciosa (LTI) é uma doença respiratória causada por um DNA vírus de cadeia dupla pertencente à família *Herpesviridae* e ao gênero *Iltovírus*, sua distribuição é mundial. Suas principais características clínicas incluem conjuntivite, diferentes faixas de morbidade e mortalidade, diminuição na produção de ovos (GARCIA; SPATZ; GUY, 2014).

Na indústria avícola mundial a doença é de grande importância, porque causa grandes perdas econômicas, como consequência dos surtos causados por cepas virulentas que diminuem a produtividade, altos níveis de mortalidade e nos lotes recuperados da doença, as aves podem desenvolver infecção latente (HUGHES et al., 1989; 1991). As cepas podem variar a sua virulência e o vírus da LTI (VLTI) tem a capacidade de reverter e aumentar a virulência na passagem de ave para ave e produzir novos surtos (GUY et al., 1989; BAGUST; JONES; GUY, 2000; GRAHAM et al., 2000).

Nos últimos anos, diversos métodos foram utilizados para conhecer a origem das cepas envolvidas nos surtos ocorridos; estes métodos incluem o isolamento viral, a amplificação e hibridização do DNA viral (ABBAS; JAMES; ANDREASEN, 1996). Além desses, outros métodos como o RFLP-PCR e o sequenciamento de DNA foram utilizados para se diferenciar as cepas vacinais das de campo (CHACON; MIZUMA; FERREIRA, 2010; PARRA et al., 2015). O RFLP em associação ao PCR em tempo real foi desenvolvido a fim de diferenciar surtos causados tanto por cepas vacinais quanto de campo (CREELAN et al., 2006).

O isolamento viral pode realizar-se a partir de material de campo, em ovos embrionados de galinha *SPF* (*specific pathogen free*) inoculados via membrana corio-alantoide (MCA), ou em cultura celular (HUGHES; JONES, 1988; SCHNITZLEIN; RADZEVICIUS; TRIPATHY, 1994; BAGUST; JONES; GUY, 2000).

Apesar do isolamento ser uma técnica amplamente usada e proporcionar resultados satisfatórios o procedimento é muito demorado (HUGHES; JONES, 1988).

A detecção do DNA pode ser realizada por PCR convencional ou por PCR em tempo real (qPCR), e estes métodos se tornaram preferidos para o diagnóstico viral (CREELAN et al., 2006; CALLISON et al., 2007; MAHMOUDIAN et al., 2011); em especial o qPCR, pela ampla aceitação, devido a sua rapidez, alta sensibilidade, reprodutibilidade e redução do risco de contaminação (MACKAY; ARDEN; NITSCHKE, 2002).

O objetivo do presente estudo foi isolar o VLT1 em ovos embrionados de galinha e avaliar a detecção e quantificação do vírus usando o PCR em tempo real (qPCR), com a tecnologia *Taqman* com o gene ICP4 (*infected cell protein 4*) como alvo.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Amostras virais

No presente estudo foram utilizadas cinquenta e duas (52) amostras armazenadas no acervo do Laboratório de Ornitopatologia (LABOR) provenientes de aves com problemas respiratórios e com suspeita clínica da doença de diferentes regiões do Brasil (Quadro 7).

Quadro 7 - Identificação das amostras

					(Continua)
Identificação amostra	Tipo de amostra	Tipo de ave	Sinais clínicos	Ano	Origem da amostra
330-2	Trigêmeo	Reprodutoras	Sim	2009	Guapiaçu
339-42	Traqueia e conjuntiva	NI	NI	2009	NI
339-82	Traqueia e conjuntiva	NI	NI	2009	NI
344-4	Trigêmeo	Postura comercial	Sim	2009	Tupã
344-9	Traqueia e conjuntiva	Postura comercial	Sim	2009	Tupã
344-10	Trigêmeo	Postura comercial	Sim	2009	Tupã
344-14	Trigêmeo	Postura comercial	Sim	2009	Tupã
355-7	Traqueia e conjuntiva	Postura comercia	Sim	2009	Bastos
360-27	Traqueia e conjuntiva	Postura comercial	Sim	2009	Iacri
360-39	Traqueia e conjuntiva	Postura comercial	Sim	2009	Bastos
367-13	Traqueia e conjuntiva	Postura comercial	Sim	2009	Bastos
373-4	Trigêmeo	Postura comercial	Sim	2009	Bastos
373-17	Traqueia e conjuntiva	Postura comercial	Sim	2009	Bastos
373-17	Trigêmeo	Postura comercial	Sim	2009	Bastos
377-16	Traqueia e conjuntiva	Postura comercial	Sim	2010	Bastos
377-17	Trigêmeo	Postura comercial	Sim	2010	Bastos
381-1	Traqueia e conjuntiva	Postura comercial	Sim	2010	Rancharia
381-3	Traqueia e conjuntiva	Postura comercial	Sim	2010	Rancharia

(Continuação)

Identificação amostra	Tipo de amostra	Tipo de ave	Sinais clínicos	Ano	Origem da amostra
381-5	Traqueia e conjuntiva	Postura comercial	Sim	2010	Rancharia
381-9	Traqueia e conjuntiva	Postura comercial	Sim	2010	Rancharia
389-13	Traqueia e conjuntiva	Postura comercial	Sim	2010	Bastos
389-15	Traqueia e conjuntiva	Postura comercial	Sim	2010	Bastos
402-1	Traqueia e conjuntiva	Postura comercial	Sim	2010	Bastos
402-11	Traqueia e conjuntiva	Postura comercial	Sim	2010	Bastos
402-25	Traqueia e conjuntiva	Postura comercial	Sim	2010	Bastos
402-39	Traqueia e conjuntiva	Postura comercial	Sim	2010	Bastos
404-5	Traqueia e conjuntiva	Postura comercial	Sim	2010	Bastos
404-29	Traqueia e conjuntiva	Postura comercial	Sim	2010	Bastos
409-2	Trigêmeo	Postura comercial	Sim	2010	Bastos
409-7	Traqueia e conjuntiva	Postura comercial	Sim	2010	Bastos
409-9	Traqueia e conjuntiva	Postura comercial	Sim	2010	Bastos
409-11	Traqueia e conjuntiva	Postura comercial	Sim	2010	Bastos
413-5	Traqueia e conjuntiva	Postura comercial	Sim	2010	Iacri
413-9	Traqueia e conjuntiva	Postura comercial	Sim	2010	Bastos
417-1	Traqueia e conjuntiva	Postura comercial	Sim	2011	Bastos
417-5	Traqueia e conjuntiva	Postura comercial	Sim	2011	Bastos

					(Conclusão)
Identificação amostra	Tipo de amostra	Tipo de ave	Sinais clínicos	Ano	Origem da amostra
417-13	Traqueia e conjuntiva	Postura comercial	Sim	2011	Bastos
417-19	Traqueia e conjuntiva	Postura comercial	Sim	2011	Bastos
417-20	Trigêmeo	Postura comercial	Sim	2011	Bastos
417-24	Trigêmeo	Postura comercial	Sim	2011	Bastos
417-25	Traqueia e conjuntiva	Postura comercial	Sim	2011	Bastos
417-26	Trigêmeo	Postura comercial	Sim	2011	Bastos
657-3	Traqueia	Postura comercial	Sim	2015	Guatapará
657-4	Trigêmeo	Postura comercial	Sim	2015	Guatapará
657-4	Pálpebra	Postura comercial	Sim	2015	Guatapará
657-5	Tonsila	Postura comercial	Sim	2015	Guatapará
657-7	Traqueia	Postura comercial	Sim	2015	Guatapará
695-1	Traqueia	Postura comercial	Sim	2016	Barretos
695-2	Pálpebra	Postura comercial	Sim	2016	Barretos
695-3	Trigêmeo	Postura comercial	Sim	2016	Barretos
USP 59	NI	NI	NI	NI	NI
USP 60	NI	NI	NI	NI	NI

Fonte: (SANTANDER-PARRA, S. H., 2016)

Legenda: NI=não informado

5.2.2 Suspensão viral

Uma alíquota das amostras, previamente maceradas, foi colocada em um 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 20 minutos a 4°C .

5.2.3 Isolamento em ovos embrionados

As amostras descritas no quadro foram inoculadas em ovos embrionados de galinha *SPF*, segundo o fluxo de atividades abaixo:

O inoculo foi preparado da seguinte forma:

- a. Um *pool* de macerado de cada amostra positiva para o VLT1 foi suspenso em PBS 0,1 M, pH 7,4 (1:1).
- b. A suspensão foi centrifugada a 12.000 x g/ 20 minutos/ 4°C .
- c. Um mililitro do sobrenadante foi recuperado, adicionando-se 20 μL de gentamicina 30mg/mL ao inoculo.
- d. Uma alíquota de 150 μL de cada amostra foi inoculada em ovos embrionados *SPF* de 10 dias de idade (n=4) pela membrana corio-alantóide (MCA), e os ovos foram incubados a 37°C por 5 dias.
- e. Os ovos foram observados sob ovoscopia, uma vez ao dia para a detecção de mortalidade. Os ovos que apresentaram morte embrionária nas primeiras 24 horas foram eliminados.
- f. Ao quinto dia pós-inoculação (PI) as MCA e o líquido alantoide foram recolhidos.

- g. As MCA colhidas foram maceradas, suspensas em PBS 0,1M, pH 7,4, tratadas com antibiótico como detalhados nos itens b e c para serem usadas na passagem subsequente.
- h. Após cada passagem, os embriões e a MCA dos ovos inoculados foram avaliadas em procura de alterações patológicas macroscópicas, como nanismo e presença de placas necróticas.
- i. O líquido alantoide (200 μ L) e a MCA (200 μ L da suspensão descrita no literal a e b) coletadas após cada passagem foram submetidos a extração de DNA e a posterior detecção e quantificação do VLTI pela técnica do qPCR através da amplificação do gene ICP4.

As amostras foram também submetidas ao *Nested-PCR* como descrito no item 4.2.4.

5.2.4 Extração do DNA viral das amostras

O DNA viral das amostras foi extraído segundo o protocolo descrito por Chomczynski (1993), como controle negativo da reação foi usado o PBS 0,1M, pH 7,4. O DNA foi dissolvido em 30 μ L de tampão Tris-EDTA (TE) e armazenada a -20°C para a realização dos testes moleculares.

5.2.5 Padronização e Desenvolvimento de uma reação de PCR em Tempo real (qPCR) para a detecção e quantificação do gene ICP4 do VLTI

Na reação de PCR com o gene ICP4 como alvo, foram utilizados 22,5 μ L de reação que continha: 0,5 μ M de cada um dos *primers* senso e antisenso (Quadro 8), 2,5 μ L de tampão 10X, 4,0 μ L de dNTPs 1,25 mM, 37,5 mM de MgCl₂ e 1,0 U de TaqDNA polimerase Platinum (Invitrogen by Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) e 2,5 μ L de cDNA. A reação de amplificação ocorreu nas seguintes condições: um

ciclo térmico de 94°C por 2 minutos, 35 ciclos de temperaturas de 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto, seguida de 72°C, por 5 minutos.

O produto gerado após a amplificação foi inserido em um vetor Pcr™ 2.1-TOPO (Invitrogen by Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), células competentes de *E. coli* TOP 10 foram transformadas e clonadas de acordo com as instruções do fabricante. O produto amplificado para o gene ICP4 apresentava 942 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 do plasmídeo obtido foi submetido a uma reação de PCR de ponto final com os *primers* e condições da reação descritas acima para se amplificar o fragmento do gene que foi inserido. O produto amplificado foi purificado usando o *kit GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) seguindo as recomendações do fabricante. O produto purificado foi sequenciado no sentido senso e antisenso nas mesmas condições do descrito no item 4.2.5. (Quadro 8).

Quadro 8 - Primers usados no qPCR para a amplificação do gene ICP4

Primer	Sequência	Reação	Referência
ICP4-F	CGCAGAGGACCAGCAAAGACCG	PCR	Ou et al., 2012.
ICP4-R	GAAGCAGACGCCGCGTAGGAT		
ICP4-F	CCCCACCCAGTAGAGGAC	qPCR	
ICP4-R	CGAGATACACGGAAGCTGATTT		
ICP4 <i>probe</i>	FAM-CAGTCTTTGGTCGATGACCCGC-TAMRA		

Fonte: (SANTANDER-PARRA, S. H., 2016)

5.2.6 Técnica da Reação em Cadeia pela Polimerase em tempo real (qPCR) para o gene ICP4

A reação de qPCR usada seguiu o protocolo descrito por OU et al. (2012) e continha um volume total de 20 µL por reação. Cada reação possuía 10 µL de *Taqman Master Mix (2X)*, 0,5 µM de cada *primer* senso e antisenso, 0,5 µL de *probe* 4 µM (0,1 µM; quadro 8), 2,5 µL de água destilada livre de nucleases (dH₂O) (Invitrogen), e 5 µL do DNA de cada amostra ou do DNA extraído do controle positivo e água destilada livre de nucleases (dH₂O) (Invitrogen) até se completar um volume de 20 µL. No controle negativo (NTC –*No Template Control*), o volume de DNA foi substituído por dH₂O. As reações foram realizadas em um termociclador *Step One Plus PCR System (Applied Biosystems)*. As condições de temperatura e ciclos foram de 95°C de ativação por 15 minutos, 40 ciclos a 95°C por 30 segundos para a desnaturação e 60°C por 60 segundos para a hibridização e extensão.

5.2.7 Determinação da sensibilidade e da curva padrão do qPCR do gene ICP4

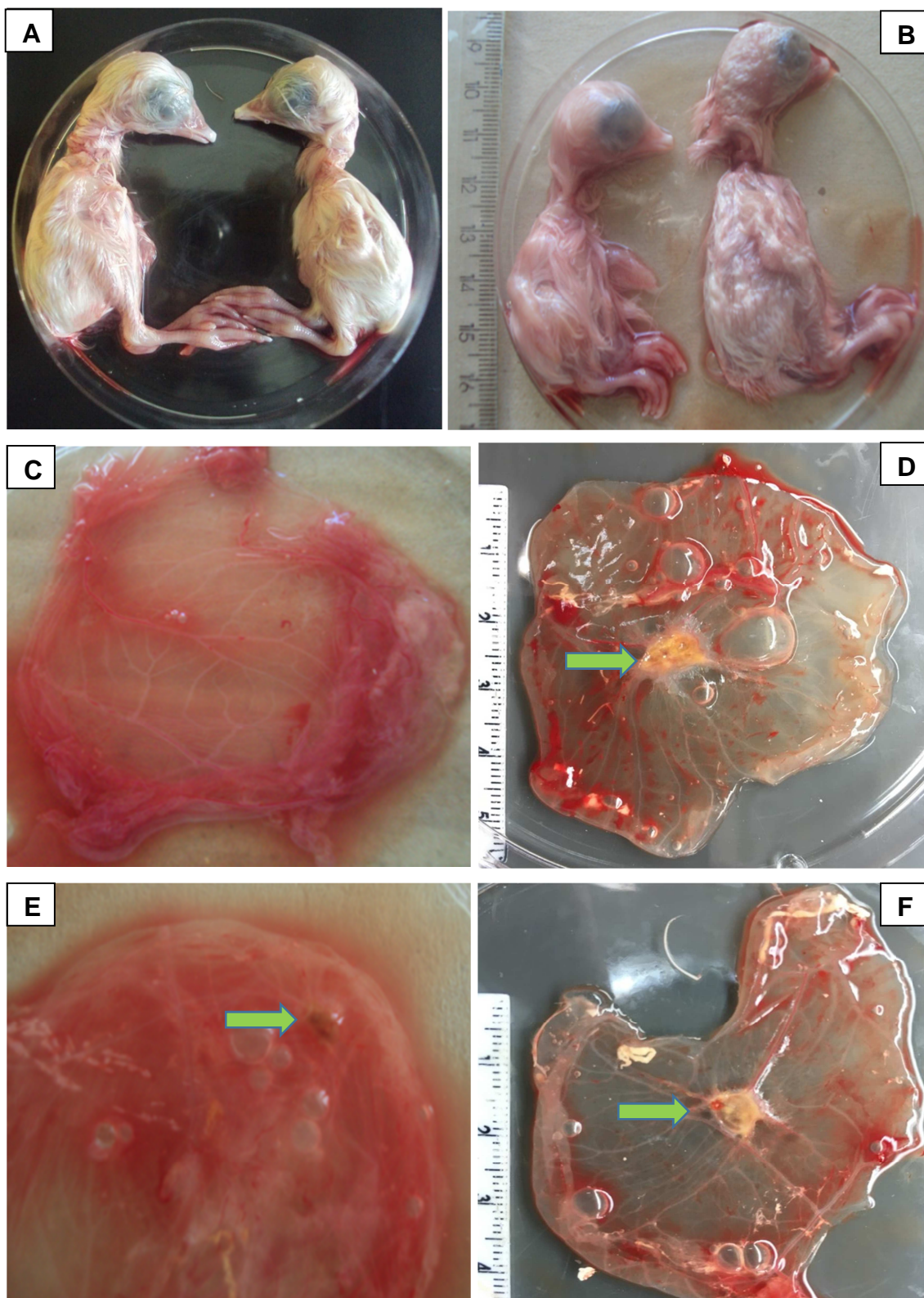
Para a determinação da sensibilidade do ensaio, o DNA do plasmídeo foi extraído e quantificado no *NanoDrop 2000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Thermo Scientific, Wilmington, USA)*. Usando a ferramenta *on-line* da *Applied Biosystem DNA Copy Number and Dilution Calculator (THERMOFISHER, 2016)* 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 10 a 100.000.000 cópias de plasmídeos. Foram determinados os limites de detecção onde a amplificação foi positiva. A eficiência da PCR também foi determinada com as diluições seriadas.

5.3 RESULTADOS

5.3.1 Isolamento em ovos embrionados

De 52 amostras inoculadas, apenas em dez (10) amostras se conseguiu o isolamento do vírus. As alterações macroscópicas encontradas nos embriões foram o nanismo quando comparados com os embriões do controle negativo, nenhuma outra alteração macroscópica foi observada no embrião. As membranas corio-alantoides (MCA) apresentavam-se mais espessas e com a presença de placas com bordas opacas e com uma área central deprimida de necrose características do vírus (Figura 7). Os embriões do grupo controle negativo não apresentaram nenhuma alteração patológica macroscópica.

Figura 7 – Lesões macroscópica encontradas nos embriões e MCA dos ovos embrionados



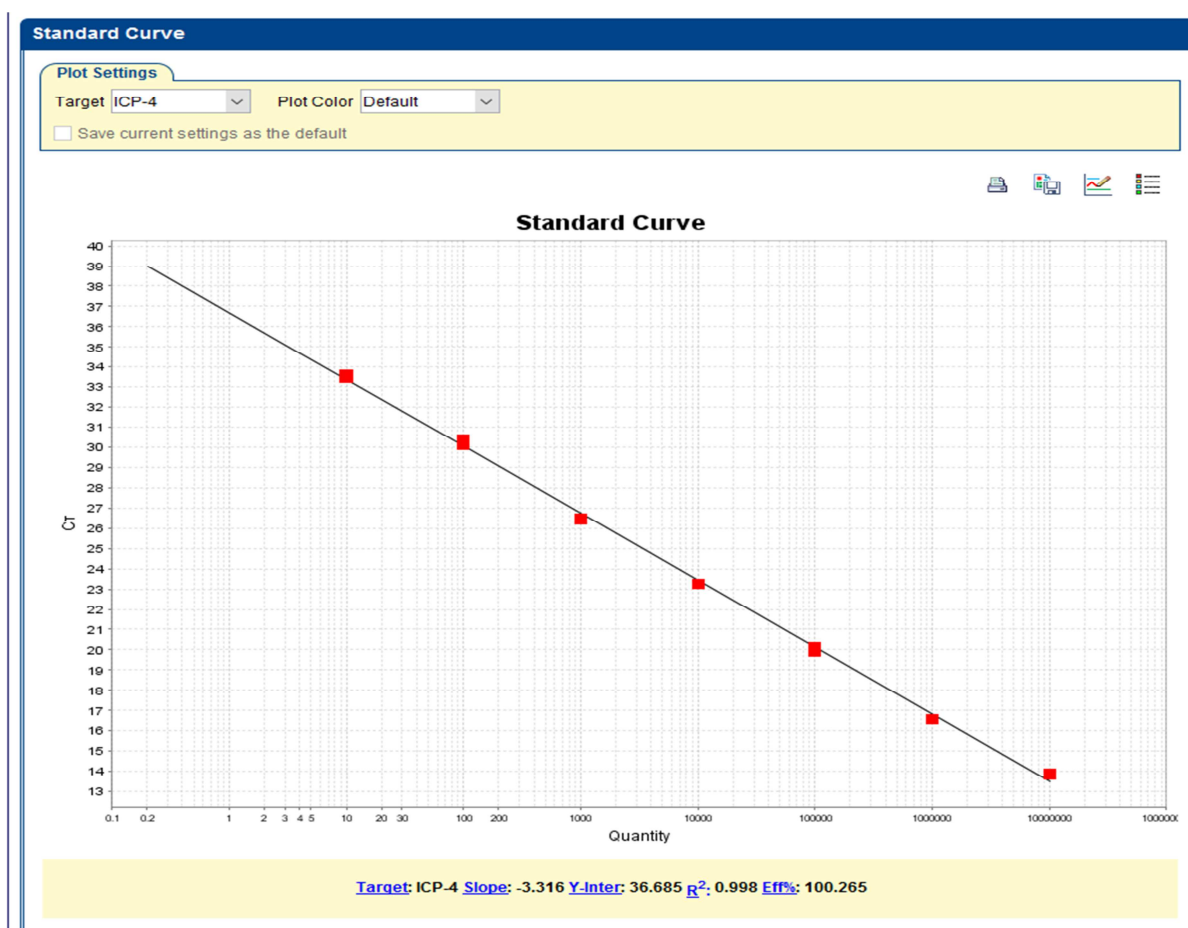
FONTE: (SANTANDER-PARRA, S. H., 2016)

Legenda: Figura 7 - A: embriões do controle negativo; B: comparação de tamanho dos embriões; C: MCA normal; D, E, F: MCA com lesão (seta).

5.3.2 Reação de PCR em Tempo real (qPCR) para a detecção e quantificação do gene ICP4 do VLTl

A qPCR para o gene ICP4 amplificou um fragmento de 126 pb o limite de detecção (LOD - *Limit of Detection*) foi de uma cópia de plasmídeo e o limite de quantificação (LOQ - *Limit of quantification*) foi de dez cópias de plasmídeo, sendo que cada cópia de plasmídeo equivale a uma partícula viral. Dessa forma, a curva padrão mostrou uma eficiência de 100,265%, com um *slope* de -3,316 e $R^2=0,998$, gerando um produto específico de amplificação (Figuras 9 e 10).

Figura 9 - Padronização da qPCR para o gene ICP4 do VLTl



Fonte: (SANTANDER-PARRA, S. H., 2016)

Legenda: Curva de eficiência gerada no desenvolvimento da reação de qPCR para a detecção e quantificação do gene ICP4 do VLTl.

Figura 10 - Padronização da qPCR para o gene ICP4 do VLTI



Fonte: (SANTANDER-PARRA, S. H., 2016)

Legenda: Gráfico de amplificação gerado no desenvolvimento da reação de qPCR para a detecção e quantificação do gene ICP4 do VLTI.

5.3.3 Detecção e quantificação do VLTI

A MCA e o líquido alantoide obtido em cada uma das passagens foram submetidos à reação de *Nested-PCR* e qPCR. O VLTI foi detectado e quantificado, confirmando a presença do vírus nos tecidos do embrião e o seu isolamento, como se mostra no quadro 9. As MCA e o líquido alantoide no grupo controle negativo obtido em cada uma das passagens foi negativo ao VLTI após ser submetido a reação do qPCR.

Quadro 9 – Resultados obtidos dos dois testes realizados no presente estudo

Identificação	Primeira Passagem				Segunda Passagem				Terceira Passagem			
	Nested-PCR gE		qPCR-ICP4		Nested-PCR gE		qPCR-ICP4		Nested-PCR gE		qPCR-ICP4	
	MCA	LIQ	MCA	LIQ	MCA	LIQ	MCA	LIQ	MCA	LIQ	MCA	LIQ
657-3 traqueia	+	+	1071,6	4553,1	+	-	434,9	382,2	+	-	263,2	1201,7
657-4 pálpebra	+	+	4410,2	1388350	+	-	118,6	245,0	+	-	128,8	102,5
657-4 trigêmeo	-	+	2283,5	362870	-	-	52,6	1111,2	+	-	1007,8	101,5
657-5 tonsila	+	+	136,2	2346,3	-	+	420,7	1673,3	+	+	97,5	19,1
657-7 traqueia	+	-	2563,0	764,2	-	+	136,2	98,7	+	+	1254,5	1551,0
695-1 pálpebra	+	-	3817,3	1658,5	+	-	658,4	102,2	+	+	464,3	157,8
695-2 traqueia	-	+	8775,3	1570,7	-	-	4482,2	1499,3	+	+	465,5	458,5
695-3 trigêmeo	+	+	1361,1	1796,8	-	-	160,4	59,5	+	-	200,6	509,2
USP-59	+	+	3006571,9	253864,6	+	+	256,9	560,5	+	-	784,0	455,2
USP-60	-	+	1430,0	1139,7	-	+	1307,9	1933,2	+	-	563,8	645,2

Fonte: (SANTANDER-PARRA, S. H., 2016)

Legenda: valores por μ L de DNA

+ = positivo

- = negativo

MCA = Membrana corio-alantoide

LIQ = líquido alantoide

5.4 DISCUSSÃO

O VLTÍ é um dos patógenos aviários que pode causar uma morbidade de até 100% e uma mortalidade variável de 5-70%, mas, geralmente os índices são de 10-20% dependendo das condições imunológicas e sanidade das aves (GARCIA; SPATZ; GUY, 2014). A importância da doença é devido as perdas de produção tanto em frangos de corte quanto em poedeiras comerciais (CHACON, 2005).

Os métodos de diagnóstico comumente utilizados para a detecção do VLTÍ são o isolamento viral em ovos embrionados e em cultura celular, histopatologia (ABBAS; JAMES; ANDREASEN, 1996), porém, estes métodos são muito trabalhosos e demorados; é por isso novos métodos foram desenvolvidos para que a detecção do vírus seja mais rápida e específica tais como RPLP, PCR, PCR em tempo real (qPCR) (CHACON; FERREIRA, 2008; MAHMOUDIAN et al., 2011; PARRA et al., 2015).

Neste estudo existiram amostras onde o isolamento nos ovos embrionados não foi possível; provavelmente porque nas amostras originais a concentração viral tenha sido muito baixa ou as amostras tivessem partículas virais inativadas (CHACON; FERREIRA, 2008). O isolamento foi possível em amostras obtidas em 2015 e 2016, isto sugere que as partículas virais das amostras que não se isolaram podem ter perdido, em consequência de congelamentos e descongelamentos, fragmentos de DNA essenciais para a replicação viral. Um estudo também demonstrou que o isolamento de uma cepa circulante em um surto, em lotes de frangos de corte, não foi fácil, e tampouco a microscopia eletrônica foi suficientemente sensível para detectar o VLTÍ mesmo nas MCA que se encontravam espessadas (CRESPO et al., 2007).

Nas amostras isoladas neste estudo, puderam se observar as lesões descritas na literatura, como a formação de placas opacas na MCA que podem variar de alguns focos dispersos até uma grande extensão (GARCIA; SPATZ; GUY, 2014).

Diversos estudos utilizaram como alvo o gene ICP4, assim, este gene é de grande importância porque possui regiões hiper variáveis (TRIST et al., 1996), que são utilizadas para se realizar estudos epidemiológicos e ajudam na diferenciação

de cepas vacinais e de campo; além de ser usado para a detecção tanto de infecções latentes quanto clínicas (CHACON; FERREIRA, 2008; CHACON; FERREIRA, 2009). Outros estudos indicaram que o gene ICP4 é um importante regulador da transcrição, sendo de grande importância na replicação viral (WAIDER et al. 2011).

Este estudo mostrou um limite de quantificação de dez partículas virais, sendo mais eficiente que o estudo orientado também ao gene ICP4 realizado por CREELAN (2006) onde o limite foi de 100 partículas virais. Também se evidenciou uma eficiente sensibilidade do ensaio já que conseguiu amplificar amostras clínicas que foram isoladas nos ovos embrionados e em amostras que foram negativas no *Nested-PCR*, sendo o alvo o gene gE.

Estudos anteriores mostraram que a MCA é o sítio de replicação viral, onde se observam as lesões e é usada para a realização das passagens subsequentes necessárias ao isolamento (CHACON, 2005; CHACON et al., 2007; ISLAM et al., 2010). Não existem estudos onde o líquido alantoide é utilizado com esta finalidade.

Neste estudo se detectou e observou um número elevado de partículas virais no líquido alantoide dos ovos embrionados que foram inoculados, inclusive em amostras que foram negativas no *Nested-PCR* convencional e em amostras onde existia um número menor de partículas virais na MCA; indicando a utilidade do líquido para a detecção do vírus. Outros estudos também demonstram que o líquido alantoide também foi usado para avaliar as propriedades biológicas de uma cepa atenuada utilizada no desenvolvimento de uma vacina viva atenuada (IZUCHI; HASEGAWA; MIYAMOTO, 1981; IZUCHI; HASEGAWA, 1983).

5.5 CONCLUSÃO

O presente estudo mostrou o isolamento de amostras do VLTI em ovos embrionados de galinha, e que o vírus foi capaz de se multiplicar e propagar além da MCA, no líquido alantoide. Mostrou também a dificuldade no isolamento do vírus quando se trata de amostras que poderiam ter uma carga viral baixa ou a presença de partículas não viáveis, principalmente, em amostras que foram armazenadas por

um tempo maior. Por outro lado, o qPCR orientado à detecção e quantificação do gene ICP4 do VLTI se mostrou um método rápido para a detecção e quantificação viral quando comparado com o *Nested-PCR* convencional, que necessita além da amplificação a realização da eletroforese para a obtenção dos resultados. Dessa forma, é um método que poderia ser usado para um rápido diagnóstico do VLTI.

REFERÊNCIAS

ABBAS, F; JAMES, R; ANDREASEN, J. comparison of diagnostic tests for infectious laryngotracheitis. **Avian Diseases**, v. 40, n. 2, p. 290–295, 1996.

BAGUST, T. J.; JONES, R. C.; GUY, J. S. Avian infectious laryngotracheitis. **Revue Scientifique et Technique-office International des Epizootiespizooties**, v. 19, n. 2, p. 483–492, 2000.

CALLISON, S. A.; RIBLET, S. M.; OLDONI, I.; SUN, S.; ZAVALA, G.; WILLIAMS, S.; RESURRECCION, R. S.; SPACKMAN, E.; GARCIA, M. Development and validation of a real-time Taqman PCR assay for the detection and quantitation of infectious laryngotracheitis virus in poultry. **Journal of Virological Methods**, v. 139, n. 1, p. 31–38, 2007.

CHACON, J. L. Vírus da laringotraqueíte infecciosa: detecção e caracterização molecular, isolamento , diagnóstico diferencial e epidemiologia de um surto em granjas de poedeiras comerciais na região de Bastos, Estado de São Paulo. 115p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Univeridade de São Paulo, São Paulo, 2005.

CHACON, J. L.; BRANDAO, P. E. B.; VILLAREAL, L. Y. B.; GAMA, N. M.; FERREIRA, A. J. P. Survey of Infectious Laryngotracheitis Outbreak in Layer Hens and Differential Diagnosis with other Respiratory Pathogens. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 9, p. 61–67, 2007.

CHACON, J. L.; FERREIRA, A. J. P. Development and validation of nested-PCR for the diagnosis of clinical and subclinical infectious laryngotracheitis. **Journal of Virological Methods**, v. 151, p. 188–93, 2008.

CHACON, J. L.; FERREIRA, A. J. P. Differentiation of field isolates and vaccine strains of infectious laryngotracheitis virus by DNA sequencing. **Vaccine**, v. 27, n. 48, p. 6731–6738, 2009.

CHACON, J. L.; MIZUMA, M. Y.; PIANTINO FERREIRA, A. J. Characterization by restriction fragment length polymorphism and sequence analysis of field and vaccine strains of infectious laryngotracheitis virus involved in severe outbreaks. **Avian Pathology**, v. 39, n. 6, p. 425–433, 2010.

CHOMCZYNSKI, P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and protein for the cell and tissues samples. **Biotechniques**, v. 15, p. 532–536, 1993.

COUTO, R. M.; PREIS, I. S.; BRAGA, J. F. V.; BRASIL, B. S. A. F.; DRUMMOND, M. G.; MARTINS, N. R. S.; ECCO, R. Molecular characterization of infectious laryngotracheitis virus in naturally infected egg layer chickens in a multi-age flock in Brazil. **Archives of Virology**, v. 160, n. 1, p. 241–252, 2014.

CREELAN, J. L.; CALVERT, V. M.; GRAHAM, D. A.; McCULLOUGH, S. J. Rapid detection and characterization from field cases of infectious laryngotracheitis virus by real-time polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism. **Avian Pathology**, v. 35, n. 2, p. 173–179, 2006.

CRESPO, R.; WOOLCOCK, P. R.; CHIN, R. P.; SHIVAPRASAD, H. L.; GARCIA, M. Comparison of diagnostics techniques in an outbreak of infectious laryngotracheitis from meat chickens. **Avian Diseases**, v. 51, n. 4, p. 858–862, 2007.

DORMITORIO, T. V.; GIAMBRONE, J. J.; MACKLIN, K. S. detection and isolation of infectious laryngotracheitis virus on a broiler farm after a disease outbreak. **BioOne**, v. 57, n. 4, p. 803–807, 2013.

GARCÍA, M.; RIBLET, S. M. characterization of infectious laryngotracheitis virus isolates : demonstration of viral subpopulations within vaccine preparations. **Avian Diseases**, v. 45, n. 3, p. 558–566, 2001.

GARCÍA, M.; SPATZ, S.; GUY, J. S. Infectious Laryngotracheitis. In: SAIF, Y. M. GLISSON, J. R.; FADLY, A. M.; McDOUGALD, L. R.; NOLAN, L. K.; SWAYNE, D.E (Org.). **Diseases of Poultry**. 13th. ed. [S.l.]: Iowa States Press, 2014. p. 161–179.

GRAHAM, D. A.; McLAREN, I. E.; CALVERT, V.; TORRENS, D.; MEEHAN, B. M. RFLP analysis of recent Northern Ireland isolates of infectious laryngotracheitis virus : Comparison with vaccine virus and field isolates from England , Scotland and the Republic of Ireland. **Avian Pathology**, v. 29, n. 1, p. 57–62, 2000.

GUY, J. S.; BARNES, H. J.; MUNJER, L. L.; ROSE, L. Restriction endonuclease analysis of infectious laryngotracheitis viruses: comparison of modified-live vaccine viruses and North Carolina field isolates. **Avian Diseases**, v. 33, p. 316–323, 1989.

HUGHES, C. S.; GASKELL, R. M.; JONES, R. C.; BRADBURY, J. M.; JORDAN, F. T. Effects of certain stress factors on the re-excretion of infectious laryngotracheitis virus from latently infected carrier birds. **Reserch in Veterinary Science**, v. 46, p. 274–276, 1989.

HUGHES, C. S.; JONES, R. C. Comparison of cultural methods for primary isolation of infectious laryngotracheitis virus from field material. **Avian Pathology**, v. 17, n. 2, p. 295–303, 1988.

HUGHES, C. S.; WILLIAMS, R. A.; GASKELL, R. M.; JORDAN, F. T. W.; BRADBURY, J. M.; BENNETT, M.; JONES, R. C. Latency reactivation of infectious laryngotracheitis vaccine virus. **Archives of Virology**, v. 121, p. 213–218, 1991.

ISLAM, M. S.; KHAN, M. S. R.; ISLAM, M. A.; HASSAN, J.; AFFROZE, S.; ISLAM, M.A. Isolation and characterization of infectious laryngotracheitis virus in layer chickens. **Blangadesh Journal of Veterinary Medicine**, v. 8, p. 123–130, 2010.

MACKAY, I. M.; ARDEN, K. E.; NITSCHKE, A. Real-time PCR in virology. **Nucleic Acids REsearch**, v. 30, n. 6, p. 1292–1305, 2002.

MAHMOUDIAN, A.; KIRKPATRICK, N. C.; COPPO, M.; LEE, S. W.; DEVLIN, J. M.; MARKHAM, P. F.; BROWNING, G. F.; NOORMOHAMMADI, A. H. Development of a SYBR Green quantitative polymerase chain reaction assay for rapid detection and quantification of infectious laryngotracheitis virus. **Avian Pathology**, v. 40, p. 237–242, 2011.

OU, S.; GIAMBRONE, J. J.; MACKLIN, K. S. Comparison of a TaqMan real-time polymerase chain reaction assay with a loop-mediated isothermal amplification assay for detection of Gallid herpesvirus 1. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 24, p. 138–141, 2012.

PARRA, S. H. S.; NUÑEZ, L. F. N.; ASTOLFI-FERREIRA, C. S.; FERREIRA, A. J. P. Persistence of the tissue culture origin vaccine for infectious laryngotracheitis virus in commercial chicken flocks in Brazil. **Poultry Science**, p. 2608–2615, 2015.

SCHNITZLEIN, W. M.; RADZEVICIUS, J.; TRIPATHY, D. N. Propagation of infectious laryngotracheitis virus in an avian liver cell line. **Avian Diseases**, v. 38, n. 2, p. 211–217, 1994.

TRIST, H. M.; TYACK, S. G.; JOHNSON, M. A.; PRIDEAUX, C. T.; SHEPPARD, M. Comparison of the genomic short regions of a vaccine strain (sa-2) and a virulent strain (CSW-1) of infectious laryngotracheitis virus (Galid herpesvirus 1). **Avian Diseases**, v. 40, n. 1, p. 130–139, 1996.

WAIDER, L. A.; BURNSIDE, J.; ANDERSON, A. S.; BERNBERG, E. L.; GEMAN, M. A.; MEYERYS, B. C.; GREEN, P. J.; MORGAN, R. W. A microRNA of infectious laryngotracheitis virus can downregulate and direct cleavage of IICP4 mRNA. **Virology**, v. 411, p. 25-31, 2011.

IZUCHI, T.; HASEGAWA, A. Pathogenicity of infectious laryngotracheitis virus as measured by chicken embryo inoculation. **Avian Diseases**, v. 26, p. 18-25, 1981.

IZUCHI, T.; HASEGAWA, A.; MIYAMOTO, T. Studies on the live-virus vaccine against infectious laryngotracheitis of chickens. II. Evaluation of the tissue-culture-modified strain C7 in laboratory and field trials. **Avian Diseases**, v. 8, p. 323-330, 1983.