JORGE LUIS CHACÓN VILLANUEVA

**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**

SÃO PAULO

2005

JORGE LUIS CHACÓN VILLANUEVA

**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**

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

Departamento:

Patologia

Área de concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientador:

Prof. Dr. Antonio José Piantino Ferreira

São Paulo

2005

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

8/10
BIBLIOTECA VIRGINIE BUFF D'ÁPICE
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
E ZOOTECNIA DA USP

19/10/05

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1575
FMVZ

Chacón Villanueva, Jorge Luis

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 / Jorge Luis Chacón Villanueva. – São Paulo : J. L. Chacón Villanueva, 2005.

115 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, 2005.

Programa de Pós-graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Prof. Dr. Antonio José Piantino Ferreira.

1. Nested-PCR. 2. Laringotraqueíte infecciosa. 3. Glicoproteína E. 4. Sequenciamento. 5. Isolamento viral. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Assistência Acadêmica

PARECER

Interessado: Jorge Luis Chacón Villanueva

Assunto: Protocolo de experimentação adotado em experimento animal.

A Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, após analisar o projeto sob o número 763/2005, intitulado: "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.", no qual foram utilizados órgãos de 480 aves, sob responsabilidade da Prof. Dr. José Antonio Piantino Ferreira, constatou que o mesmo foi realizado de acordo com os princípios de bioética, adotados por esta Comissão.

São Paulo, 19 de outubro de 2005

Profa. Dra. Julia Maria Malera

Presidente da Comissão de Bioética

FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: CHACÓN VILLANUEVA, Jorge Luis

Título: 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

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

Data: __/__/__

Banca examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

A Deus, pela vida.

À Virgem Maria, pelo amor.

A Jesus, pelo exemplo.

A Jorge e Vilma

Verdadeiros exemplos de amor de paternal.

Pela inspiração, confiança, apoio e carinho...

Obrigado por sempre.

Esta tese também é de vocês.

A Juan José e Ruy Diego

Irmãos, companheiros e amigos.

Obrigado pelo seu permanente apoio e carinho.

A Pilar

Fonte de motivação, compressão e amor.

Obrigado por estar sempre a meu lado.

Obrigado Cosita Rica.

À Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Por despertar em mim a curiosidade científica

À Universidade de São Paulo

Pela oportunidade de iniciar-me no caminho da pesquisa

Ao Prof. Dr. Antonio José Piantino Ferreira pela acolhida no Laboratório de Ornitopatologia, pela confiança depositada e pela orientação no presente trabalho.

A Laura Villarreal, pela constante ajuda, pelos ensinamentos e principalmente, pela amizade.

A Paulo Eduardo Brandão pelas sugestões, ensinamentos e amizade oferecida.

À Dra. Claudete pela valiosa colaboração neste estudo e pela amizade.

A meus amigos e colegas do Laboratório de Ornitopatologia, Carina, Antonio Carlos, Amarílis, Mario Sergio, Marcelo, Liliana, Gabriela e Eliana, pelo apoio e grata convivência.

À Sra. Maria Jose Aparecida Louro pela ajuda, eficiência e amizade.

A meus amigos Sabrina S., Alexandre S., André S. e David M. pela ajuda prestada.

Aos docentes da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia e do Instituto de Ciências Biológicas da USP que contribuíram no meu crescimento acadêmico e profissional.

Às secretarias Sandra, Claudia, Dayse, Silvia e Lázara pelo valioso apoio.

Aos Drs. Fernando Buchala e Anselmo Luchese da Secretaria de Agricultura do Estado de São Paulo e à Dra. Nilce S. Gama pelo apoio na colheita das amostras.

Ao Laboratório Biovet pelo fornecimento dos ovos embrionados para o experimento.

A todos aqueles que direta ou indiretamente cooperaram na realização deste trabalho.

Ao CNPq e à República Federativa do Brasil, pelo auxílio concedido para a realização deste mestrado.

RESUMO

CHACÓN VILLANUEVA, 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.** [Infectious laryngotracheitis virus: detection and molecular characterization, isolation, differential diagnosis and epidemiology of an outbreak in commercial layer flocks in Bastos region, São Paulo State]. 2005. 115 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

O presente trabalho descreve o desenvolvimento de uma técnica de *nested*-PCR para a detecção de ADN do vírus da laringotraqueíte infecciosa (VLTi) utilizando primers que amplificam uma região do gene que codifica a glicoproteína E viral. A técnica padronizada amplificou amostras isoladas e de campo, mostrando alta sensibilidade e especificidade tomando o isolamento em ovos embrionados SPF como técnica de referência. O seqüenciamento de uma amostra positiva por *nested*-PCR confirmou a identidade do produto amplificado. Foram submetidas a *nested*-PCR padronizada amostras de traquéia, pulmão e conjuntiva de 51 granjas de poedeiras comerciais procedentes da região de Bastos, Estado de São Paulo, que apresentou um surto caracterizado por sinais respiratórios, queda na produção de ovos e aumento da mortalidade. Vinte e três granjas foram positivas a *nested*-PCR e vinte e duas amostras foram isoladas. Considerando os resultados das duas técnicas, vinte e quatro granjas resultaram positivas. Não foram detectados os vírus das doenças de Newcastle, pneumovirose aviária, nem *Mycoplasma gallisepticum*. O vírus da bronquite infecciosa das galinhas foi detectado em uma granja, e *Mycoplasma synoviae* em oito. A alta frequência de ocorrência do VLTi, a alta concordância entre o quadro clínico observado e detecção do VLTi e o resultados do diagnóstico diferencial demonstram que o VLTi foi o agente etiológico causador

de um surto de doença respiratória observado na região de Bastos, Estado de São Paulo.

Palavras-chave: *Nested*-PCR. Laringotraqueíte infecciosa. Glicoproteína E. Sequenciamento. Isolamento viral.

ABSTRACT

CHACÓN VILLANUEVA, J. L. **Infectious laryngotracheitis virus**: detection and molecular characterization, isolation, differential diagnosis and epidemiology of an outbreak in commercial layer flocks in Bastos region, São Paulo State. [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]. 2005. 115 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

The present work describes the development of a nested-PCR technique for the detection of Infectious laryngotracheitis virus (ILTV) DNA using *primers* to amplify a region that encodes the glycoprotein E. The standardized technique amplified isolated and from clinical strains, offering high sensitivity and specificity, using the isolation in SPF chicken embryos such as reference test. The identity of the amplified product of the nested-PCR was confirmed by DNA sequencing. Trachea, lung and conjunctiva samples from fifty-one commercial layer farms from Bastos region, São Paulo State, which showed an outbreak characterized by respiratory signs, decreased egg production and increased mortality, were tested by the standardized nested-PCR. Twenty-three farms were positive by nested-PCR and samples of twenty-two farms were isolated. Twenty-four farms were positives when the results of both techniques were considered. Newcastle disease virus, Avian Pneumovirus and *Mycoplasma gallisepticum* were not detected. Infectious bronchitis virus was detected in one farm and *Mycoplasma synoviae* was detected in eight farms. The high frequency of occurrence of ILTV, the high agreement between clinical signs observed and ILTV detection and the results of differential diagnosis demonstrate that ILTV was the etiological agent of an outbreak respiratory disease observed in Bastos region, São Paulo State.

Key words: *Nested*-PCR. Infectious laryngotracheitis. Glicoprotein E. Sequencing.
Virus isolation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Eletróforese dos produtos de PCR e <i>nested</i> -PCR obtidos das amostras de VLTI. Coluna A-E: amostras de campo; F: controle positivo; G: controle negativo; H: Padrão de peso molecular 100 pb (GIBCO)	69
Figura 2 -	Alinhamento de nucleotídeos de um segmento do gene codificador da glicoproteína E (g E) do vírus da laringotraqueíte infecciosa	71
Figura 3 -	Deteção do VLTI em amostras de granjas de poedeiras comerciais pela técnica de <i>nested</i> -PCR	72
Figura 4 -	Deteção do VLTI em amostras de granjas de poedeiras comerciais pela técnica de <i>nested</i> -PCR segundo o histórico clínico	73
Figura 5 -	Deteção do VLTI em amostras de granjas de poedeiras comerciais pela técnica de <i>nested</i> -PCR após análise de traquéia (T), pulmão (P) e conjuntiva (C)	73
Figura 6 -	Isolamento do VLTI em ovos embrionados de galinha SPF inoculado via membrana corioalantóide	75
Figura 7 -	Isolamento do VLTI em ovos embrionados de galinha SPF depois da inoculação pela MCA. Notar as placas esbranquiçadas sobre a MCA	75
Figura 8 -	Deteção de lesões em embriões SPF causados pela inoculação do VLTI, via membrana corioalantóide	76
Figura 9 -	Deteção do VLTI por <i>nested</i> -PCR e isolamento viral em amostras de granjas de poedeiras comerciais procedentes de Bastos (SP)	78
Figura 10 -	Deteção do VLTI por <i>nested</i> -PCR antes e depois do isolamento viral	79
Figura 11 -	Deteção do VLTI em granjas de postura comercial da região de Bastos (SP)	79
Figura 12 -	Histórico clínico das granjas positivas ao VLTI	80
Figura 13 -	Etapa produtiva das aves nas granjas positivas ao VLTI	80
Figura 14 -	Agentes respiratórios detectados em amostras de granjas de postura comercial com doença respiratória	84
Figura 15 -	Doenças envolvidas no surto com sinais respiratórias em granjas de postura comercial	84

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	<i>Primers</i> usados para a detecção do gene codificador da glicoproteína E	55
Quadro 2 -	<i>Primers</i> usados para a detecção do gene codificador da proteína de fusão do vírus da doença de Newcastle	61
Quadro 3 -	<i>Primers</i> usados para a detecção do gene codificador da região 3' UTR do genoma do vírus da bronquite infecciosa	62
Quadro 4 -	<i>Primers</i> usados para a detecção do gene codificador da glicoproteína G do Pneumovírus aviário	64
Quadro 5 -	<i>Primers</i> usados para a detecção de <i>Mycoplasma gallisepticum</i>	65
Quadro 6 -	<i>Primers</i> usados para a detecção de <i>Mycoplasma synoviae</i>	66
Quadro 7 -	Amostras clínicas associadas à doença respiratória e aumento de mortalidade, procedentes da região de Bastos (SP) e recebidas durante o 2003. Comparação entre métodos de detecção do VLTII (LABOR-FMV-USP)	81

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BIG	=	bronquite infecciosa das galinhas
dNTP	=	base nitrogenada (A, C, G ou T)
CI	=	corpúsculo de inclusão intranuclear
DNA	=	ácido desoxiribonucléico
EDTA	=	ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	=	<i>Enzyme linked imunossorbent assay</i>
et al.	=	e colaboradores
g	=	aceleração da gravidade terrestre ($9,8\text{m/s}^2$)
gE	=	glicoproteína E
LTI	=	laringotraqueíte infecciosa
M	=	molar
MCA	=	membrana corioalantóide
MG	=	<i>Mycoplasma gallisepticum</i>
mg	=	miligrama
ml	=	mililitro
mM	=	milimolar
MS	=	<i>Mycoplasma synoviae</i>
NC	=	doença de Newcastle
Ng	=	nanograma
OIE	=	Organização internacional de epizootias
PBS	=	solução tampão fosfato
PCR	=	reação em cadeia pela polimerase
pH	=	potencial hidrogeniônico
PI	=	pós-infecção
pmol	=	picomol
RNA	=	ácido ribonucléico
RT	=	transcrição reversa
SPF	=	<i>specific patogen free</i>
TE	=	tampão TRIS-EDTA
TRIS	=	hidroximetil-aminometano
U	=	unidade internacional

VBIG	=	vírus da bronquite infecciosa das galinhas
VLTI	=	vírus da laringotraqueíte infecciosa
VNC	=	vírus da doença de Newcastle
VPA	=	vírus da pneumovirose aviária
μL	=	microlitro

Nota: Visto terem seu uso consagrado na literatura técnica, algumas abreviaturas seguem as iniciais de sua grafia no idioma inglês.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	28
2	REVISÃO DA LITERATURA	31
3	OBJETIVOS	49
4	MATERIAIS E MÉTODOS	50
4.1	LOCALIZAÇÃO	50
4.2	HISTÓRICO	50
4.3	AMOSTRAGEM	51
4.4	AMOSTRA PADRÕES	51
4.5	EXTRAÇÃO DE DNA	52
4.6	EXTRAÇÃO DE RNA	53
4.7	PADRONIZAÇÃO DE UMA REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR) PARA DETECÇÃO DO VIRUS DA LARINGOTRAQUEITE INFECCIOSA (VLTi)	54
4.7.1	Desenho e síntese dos <i>Primers</i>	54
4.7.2	Amplificação	55
4.7.3	Detecção do produto amplificado	56
4.7.4	Sensibilidade e especificidade analítica	56
4.7.5	Seqüenciamento de DNA	57
4.8	DETECÇÃO DO VLTi EM AMOSTRAS DE CAMPO POR PCR	59
4.9	ISOLAMENTO DO VLTi EM OVOS EMBRIONADOS SPF	59
4.10	DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL	60
4.10.1	Detecção do vírus da doença de Newcastle	60
4.10.2	Detecção do vírus da bronquite infecciosa	62
4.10.3	Detecção do pneumovírus aviário	63
4.10.4	Detecção de <i>Mycoplasma gallisepticum</i>	65
4.10.5	Detecção de <i>Mycoplasma synoviae</i>	66
5	RESULTADOS	68

5.1	PADRONIZAÇÃO DA REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE PARA A DETECÇÃO DO VLTl	68
5.1.1	Desenho dos <i>primers</i>	68
5.1.2	Detecção do VLTl	68
5.1.3	Sensibilidade e especificidade analítica	69
5.1.4	Seqüenciamento de DNA	70
5.2	DETECÇÃO DO VLTl EM AMOSTRAS DE CAMPO POR PCR	72
5.3	ISOLAMENTO DO VLTl EM OVOS EMBRIONADOS SPF	74
5.4	DETECÇÃO DO VLTl POR PCR E ISOLAMENTO VIRAL	77
5.5	DETECÇÃO DE OUTROS AGENTES RESPIRATÓRIOS	83
6	DISCUSSÃO	85
7	CONCLUSÕES	102
	REFERÊNCIAS	104

1 INTRODUÇÃO

A indústria avícola atual é caracterizada pela produção de carne e ovos de forma cada vez mais precoce, e pela criação de aves em alta densidade populacional. Outra característica, mais freqüentemente observada na avicultura de postura comercial, é a concentração de unidades produtoras em uma mesma região ou área geográfica.

A criação de aves em sistema de confinamento leva a uma pior qualidade do ar respirado, com conseqüente lesão do sistema respiratório, e criação de condições ideais para a instalação e multiplicação de agentes infecciosos que possuem tropismo para este sistema. A manifestação clínica dessas doenças provoca lesões no sistema respiratório e perdas irrecuperáveis no desempenho do lote.

As doenças que se manifestam com sinais respiratórios são as que causam maiores perdas econômicas à avicultura industrial. Entre estas, a Influenza aviária e a doença de Newcastle, enfermidades da lista A da Organização internacional de epizootias (OIE) e de notificação obrigatória, são de maior impacto econômico devido à alta mortalidade e às restrições comerciais internacionais que originam à indústria avícola nacional. Outras doenças de importante efeito patogênico sobre as aves e que podem produzir elevadas perdas à avicultura industrial são bronquite infecciosa, laringotraqueíte infecciosa, pneumovirose aviária, e micoplasmose ocasionada por *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae*. Também é freqüente encontrar quadros respiratórios de etiologia complexa onde múltiplos agentes atuam de forma sinérgica, levando a um agravamento do quadro clínico. Nestes casos, o diagnóstico clínico torna-se difícil, devendo recorrer-se ao

diagnóstico laboratorial, para se detectar a ocorrência do agente(s) envolvidos(s), e se é possível seu isolamento e identificação.

A laringotraqueíte infecciosa (LTI) é uma infecção viral altamente contagiosa que acomete o trato respiratório das aves, podendo produzir altas perdas econômicas à avicultura comercial, devido à elevada mortalidade, severa queda na produção de ovos e diminuição no desempenho das aves (GUY; BAGUST, 2003).

Desde seu primeiro relato em 1925, a doença foi descrita em vários países nos quais permanece endêmica como uma doença importante, principalmente em áreas de criação intensiva, com alta densidade e com granjas de múltiplas idades, como na América do Norte, Europa, África, China, Sudoeste da Ásia, Nova Zelândia, Austrália e Polônia. As formas severa e assintomática já foram descritas e continuam sendo relatadas até anos recentes em diferentes países (COVER, 1996; HIDALGO, 2003; LINARES et al., 1994; SELLERS et al., 2004; SMIETANKA, 2003).

Na década de 1970, pela primeira vez no Brasil, o VLTl foi isolado de galinhas com sinais respiratórios, intensa traqueíte hemorrágica e mortalidade em Petrópolis, Rio de Janeiro (BELTRÃO et al., 2003). Vargas em 1995 detectou anticorpos contra o VLTl em granjas do Estado de Rio Grande do Sul, embora não tenha encontrado sinais da doença aguda, nem tenha feito tentativas de isolar o agente (BELTRÃO et al., 2004).

No final do ano 2002, foram relatados surtos suspeitos de laringotraqueíte infecciosa em galinhas de postura comercial na região de Bastos, Estado de São Paulo. O VLTl disseminou-se rapidamente na região que é responsável por mais de 30% da produção de ovos do Estado de São Paulo e 15% da produção nacional, e caracteriza-se por criações intensivas com variados níveis de biosegurança (SAGESSE, 2005). Os surtos eram caracterizados por sinais respiratórios severos,

mas de curta duração, queda na produção de ovos, diminuição do consumo de ração e mortalidade que atingiu até mais de 300 000 aves na região, o que levou a grandes perdas econômica. Medidas quarentenárias foram implementadas pelos avicultores sob a coordenação das autoridades sanitárias estaduais.

Assim sendo, o diagnóstico laboratorial é uma necessidade relevante para a detecção do agente ou agentes etiológicos envolvidos no surto respiratório. Somente o diagnóstico destes patógenos permitirá que medidas de controle e prevenção sejam tomadas para diminuir as perdas produtivas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

O vírus causador da laringotraqueíte infecciosa (VLTi), taxonomicamente identificado como *Herpesvirus Galídeo 1*, é classificado na família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae*. A subfamília compreende importantes patógenos para humanos e animais como o vírus herpes simples (*Simplexvirus*); o vírus da Pseudorína suína (*Varicellovirus*), e os alphaherpesvírus aviários (o vírus da doença de Marek e o vírus da LTI) (JOHNSON; TYACK 1995; METTENLEITER, 2003; ROIZMAN, 1982). Muitos Alphaherpesvírus podem infectar um número variável de células *in vivo* e *in vitro*, incluindo as células epiteliais que representam o sítio primário de replicação viral. Não entanto, os alphaherpesvírus podem mostrar pronunciado neurotropismo (FERRARI et al., 2000; METTENLEITER 2003).

Utilizando as análises genealógicas obtidas a partir de seqüências de aminoácidos da glicoproteína D (gD) do VLTi e dos genes homólogos dos outros alphaherpesvírus, há sugestões de que o VLTi, mais proximamente relacionado ao grupo simplex, represente um exemplo ancestral dentro da subfamília *Alphaherpesvirinae* (JOHNSON; TYACK, 1995).

Compondo o vírion, o qual tem forma icosaédrica e varia de 120 a 300 nm em diâmetro, encontra-se um capsídio de 80 a 100 nm de diâmetro composto por 162 capsômeros, envolto por um envelope derivado de membranas celulares modificadas com numerosas espículas glicoproteicas que se projetam para o exterior. Entre o capsídio e o envelope, pode ser encontrada uma estrutura de aspecto fibroso, em microscopia eletrônica por coloração negativa, denominada de tegumento (METTENLEITER 2003; ROIZMAN, 1996). Embora o VLTi seja envelopado, apresenta alta resistência aos vários desinfetantes comerciais utilizados

pela indústria avícola na presença de matéria orgânica, mas tem se mostrado sensível ao clorofórmio, éter, cresol 3%, fenol 5% e iodóforos. Há relatos que indicam que a partícula viral pode se manter infectante no exsudato traqueal e na carcaça das aves por períodos de 10 a 100 dias, em temperatura de 13 a 23°C (GUY; BAGUST, 2003; RUANO; EL-ATTRACHE; VILLEGAS, 2001).

A informação genética está compreendida em uma molécula de DNA de fita dupla linear de aproximadamente 155 kb, consistindo de uma região longa única (UL) de 120 kb e uma região curta única (US) de 17 kb, flanqueada por duas repetições chamadas de seqüências repetidas invertidas (IR e TR) de 9 kb cada uma (JONHSON, 1991; WILD; COOK; COCHRAN, 1996). Embora o DNA do VLTlI encontre-se na classe D dos genomas da família *Herpesviridae*, o mesmo apresenta características exclusivas, como uma inversão interna dentro da região UL e genes específicos, num total de 21 genes identificados (FUCHS et al., 2000; GRIFFIN, 1989).

As glicoproteínas são os constituintes virais responsáveis pela estimulação da resposta imune humoral e celular, sendo importantes na interação vírus-hospedeiro (METTENLEITER, 1991; ROIZMAN; SEARS, 1996; SPEAR, 1984). York et al. (1990) descreveram que os principais compostos imunogênicos do vírus são as glicoproteínas B (gB), C (gC), D (gD), X (gX) e K (gK). Estudos funcionais das glicoproteínas dos herpesvírus revelaram que as gB, gD, gH e gK são essenciais para a replicação viral, em quanto que gC, gE, gG, gI e gJ, não são essenciais, mas estão envolvidas em importantes funções virais, como o reconhecimento das células alvo e na virulência (BABIC, 1996; METTENLEITER, 1991).

Dentre as glicoproteínas não essenciais, a deleção dos genes das gC, gG, gM ou gN não impediu a invasão em neurônios e a disseminação transneuronal.

Contudo, a ausência da gE diminui a transferência transneuronal, em particular no parassimpático e no gânglio trigêmeo (FERRARI et al., 2000; METTENLEITER, 2003).

A glicoproteína E (gE) é importante na expressão da virulência do vírus da pseudorraiva (VPr) e do herpesvírus felino e dependendo da célula hospedeira, esteve envolvida na disseminação célula-célula e na liberação do (VPr) da célula infectada (BABIC, 1996; KRUGER; SUSSMAN; MAES, 1996; METTENLEITER, 1991). Num estudo dirigido por Kruger, Sussman e Maes (1996), com cepas do herpesvírus felino que apresentavam deleção dos genes para as gE e gI, demonstrou-se que estas glicoproteínas eram importantes imunogênicos. Entretanto, análises das seqüências de 20 cepas do VLT1, indicaram que a gE possuía regiões altamente conservadas (HUMBERD et al., 2002).

O vírus inicia a infecção através de ligação ao receptor celular e da fusão do envelope viral com a membrana plasmática da célula alvo. O nucleocapsídeo é liberado para o citoplasma sendo transportado à membrana nuclear. O DNA viral é liberado do nucleocapsídeo e transportado ao núcleo celular através dos poros nucleares. Os processos de transcrição e replicação acontecem dentro do núcleo, e o DNA viral envolto pelo nucleocapsídeo obtém o envelope por migração pela membrana nuclear. Assim, a partícula viral migra pelo retículo endoplasmático e é acumulada em vacúolos no citoplasma. Os virions são liberados por lise celular ou por fusão da membrana vacuolar e exocitose (GUO et al., 1993; METTENLEITER, 2003; PRIDEAUX et al., 1992).

Apesar das cepas do VLT1 parecerem antigenicamente similares, estudos de proteção cruzada, testes de neutralização e imunofluorescência determinaram que a virulência varia consideravelmente, resultando em infecções que vão de subclínicas

ou assintomáticas (forma endêmica) até uma doença respiratória severa com alta morbidade e mortalidade (forma epizootica) (BAGUST, 2003; BAUER; LOHR; KALETA, 1999; GUY; HIDALGO, 2003). A diferenciação de cepas de diferentes graus de virulência, particularmente dos vírus de campo e vírus vivo vacinal é de particular importância. Desta forma, vários métodos para a diferenciação do VLTl tem sido estudados: como a virulência em ovos embrionados e em frangos (IZUCHI; HASEGAWA, 1982), a análise de polimorfismo de comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP) e ensaios de hibridação de DNA (ANDREASEN; GLISSON; VILLEGAS, 1990; CLAVIJO; NAGY, 1997; GARCIA; RIBLET, 2001; GUY et al., 1989; HAM; KIM, 2001a; HAM; KIM, 2001b; HAM; KIM, 2003; KOTIW; WILKS; MAY, 1982; LEIB et al., 1986). Mais recentemente, o sequenciamento genético e a reação em cadeia da polimerase (PCR) em combinação com o RFLP vêm sendo muito usados em estudos epidemiológicos de surtos de campo para a diferenciação de vírus selvagem do vírus vivo vacinal (ANDREASEN; GLISSON; VILLEGAS, 1990; GUY et al., 1989; KEELER et al., 1993; KELLER et al., 1992).

Os frangos são os hospedeiros naturais do vírus da laringotraqueíte, sendo susceptíveis as aves de todas as idades, porém, os sinais clínicos são principalmente observados em aves adultas (COVER, 1996). Não entanto, ainda não está bem esclarecida a susceptibilidade ligada à linhagem genética ou ao sexo. Faisões também podem ser afetados por este vírus (IZUCHI; HASEGAWA, 1982). Além disso, o VLTl foi também isolado de galinha d'angola procedente de uma granja com histórico de doença respiratória (BAUTISTA, 2003). Experimentalmente, a doença foi reproduzida em perus e soroconversão foi encontrada em patos (COVER, 1996).

As aves são infetam-se com o VLTl através do trato respiratório superior e por via ocular, sendo as aves com infecção clínica as principais transmissoras do vírus. Outras fontes de transmissão implicadas em surtos nos EEUU são as aves com infecções latentes, materiais de cama e fômites contaminados. Os sinais clínicos geralmente aparecem 6 a 12 depois da exposição natural (COVER, 1996).

O VLTl multiplica-se principalmente no epitélio da laringe e traquéia, e em outras membranas e tecidos como conjuntiva, seios nasais, sacos aéreos e pulmões. O vírus está presente na traquéia e na secreção traqueal por 6 a 8 dias pós-infecção (PI) e pode manter-se em baixa concentração por até 10 dias PI (BAGUST, 1986).

Uma característica das infecções por herpesvirus é a capacidade deste permanecer no hospedeiro infectado após a infecção aguda em um estado de latência (METTENLEITER, 1991; WILLIAMS et al., 1992b). O estado de portador é caracterizado por períodos de latência intercalados com curtos, intermitentes e espontâneos episódios de disseminação do vírus (HUGHES et al., 1989). O gânglio trigêmeo, principal lugar de latência viral, representa a principal inervação sensorial aos tecidos do trato respiratório superior. O vírus pode ser encontrado de 4 a 7 dias depois da infecção no gânglio trigêmeo e pode permanecer ali por até 15 meses, o vírus pode ser também encontrado em estado de latência na traquéia (BAGUST, 1986; HUGHES et al., 1987; WILLIAMS et al., 1992b).

O processo de latência ocorre pela integração do DNA genômico viral ao DNA da célula hospedeira ou pela manutenção do DNA viral sob forma circular no núcleo das células de modo extracromossômico. Isto acontece tanto com amostras de campo como em amostras vacinais tendo uma óbvia implicação na epidemiologia da doença. Uma vez latente, o vírus não é apresentado ao sistema imune por não

existir expressão de suas proteínas, o que impede tanto a ação do sistema imune na defesa do animal acometido quanto a detecção de resposta imune por provas sorológicas. Com isso, uma fonte de infecção não é detectada, não sendo excluída do lote, podendo vir a transmitir o VLTl para aves susceptíveis de modo esporádico, ao longo de toda a vida. Isto constitui a maior evidencia que o estabelecimento de latência pode ser um fator significativo na sobrevivência do vírus por longos períodos (BAGUST; JOHNSON, 1995; BAGUST, 1986; BAGUST; CALNEK; WFAHEY, 1986; GUY et al., 1989; HAN; KIM, 2003; HUGHES et al., 1987; WILLIAMS et al., 1992b). Bagust (1986) demonstrou que as infecções latentes podem ser estabelecidas na ausência de sinais clínicos observáveis e com baixas concentrações de vírus.

A expressão do DNA viral latente em virions é promovida por fatores estressantes e/ou alterações hormonais, como o início da postura, a entrada da ave a um lote ou a muda forçada em aves de postura (HUGHES et al., 1987; HUGHES et al., 1989; WILLIAMS et al., 1992a). O VLTl reativado do estado latente tem a capacidade de causar doença com o mesmo grau de intensidade que a causada pelo vírus isolado de casos de infecção aguda. Da mesma forma, o vírus vacinal que se dissemina depois de um estado de latência também tem a capacidade de causar o quadro clínico em aves susceptíveis (HUGHES et al., 1991; WILLIAMS et al., 1992a).

É bem documentado o potencial do VLTl de baixa de virulência, de se transformar em vírus de alta virulência, capaz de produzir doença clínica. Estudos experimentais utilizando vírus de baixa virulência, isolados de casos clínicos e procedentes de vacinas, demonstraram um aumento da virulência depois de várias passagens ave-ave (GUY; BARNES; SMITH, 1991; KOTIW; WILKS; MAY, 1995).

Foi relatado que diferentes cepas de alphaherpesvirus têm capacidade de recombinação *in vivo* e *in vitro* (FUJITA et al., 1998; GLAZENBURG et al., 1995; KINTNER; ALLAN; BRANDT, 1995). Experimentalmente, depois de uma infecção mista com duas cepas pouco virulentas do herpesvirus simples obteve-se uma cepa recombinante com maior virulência que as cepas originais (BRAUNDT; GRAU, 1990; JAVIER et al., 1986). Bem-Porat et al.¹ (1984 apud WHETSTONE; WHEELER; REED, 1986, p. 1793) demonstraram, trabalhando com isolados de campo do vírus da Pseudorabia, que alterações nos padrões de restrição eram causados pela deleção ou aquisição de seqüências que não afetavam a viabilidade viral. Não existem estudos sobre a recombinação do VLTi, mas pode-se considerar que o aumento da virulência das cepas vacinais poderia ser devido a mutações pontuais em genes relacionados à virulência ou pela recombinação de cepas virulentas e não virulentas (HAM; KIM, 2001b). Amostras isoladas de campo com padrões de restrição semelhantes tanto às das cepas vacinais como de outras cepas virulentas de campo justificam esta hipótese (HAN; KIM, 2001a).

A forma endêmica ou subclínica da infecção vem se manifestando em áreas de criação intensiva. Nestes casos, podem ser observados sinais inespecíficos como uma leve traqueíte mucóide, sinusite, conjuntivite, morbidade variável e baixa mortalidade (HIDALGO, 2003; SELLERS et al., 2004; TIMURKAAN et al., 2003). No tanto, os sinais clínicos associados com a forma severa incluem depressão, dispnéia, espirro, descarga nasal, conjuntivite, expectoração de secreção sanguinolenta. A taxa de morbidade é alta (100%) e a mortalidade poderá chegar a 70%, embora se situem entre 10 e 40% (COVER, 1996; GUY; BAGUST, 2003; HAYASHI et al., 1985; SELLERS et al., 2004). Um achado comum em galinhas

¹ BEN-PORAT, T.; DEATLY, A.; EASTERDAY, B. Latency of pseudorabies virus. In: WITTMANN, G.; GASKELL, R. **Latent herpes virus infections in veterinary**. Boston: Martinus, 1984. p. 365-383.

acometidas por o VLTl de alta virulência é o tampão de cáseo que se forma na luz traqueal. Isto impede a respiração normal da ave, fazendo-a esticar o pescoço para respirar, um sinal clínico importante nesta doença. As aves que contem altas quantidades de exsudatos caseosos com dispnéia produzem estertores (COVER, 1996).

As lesões mais importantes são observadas na laringe e na traquéia, onde pode ser encontrado um processo inflamatório que pode variar de mucoso a hemorrágico. Na traquéia, lesões diftéricas ou hemorrágica na mucosa, com tecido necrosado ao longo da mesma podem ser encontradas, podendo estender-se até os brônquios, pulmões e sacos aéreos. Também pode ser encontrada intensa hemorragia na luz traqueal (LINARES et al., 1994). As Aves que manifestam a forma branda da doença podem apresentar edema, inflamação e congestão do epitélio da conjuntiva e seios infraorbitais, além de traqueíte catarral que se manifesta de modo leve (COVER, 1996; HIDALGO, 2003; SELLERS et al., 2004).

A replicação viral na traquéia leva ao aparecimento de lesões microscópicas como infiltração de linfócitos, histiocitos e plasmócitos na mucosa e na submucosa, perda de cílios, edema celular e formação de sincícios. Estas mudanças levam a descamação epitelial com exposição de capilares e subseqüentes hemorragias. Corpúsculos de inclusão intranucleares (CI) podem ser visíveis entre o primeiro e o quinto dia PI, desaparecendo devido à descamação do epitélio (GUY; BARNES; SMITH, 1992; GUY; BAGUST, 2003; HIDALGO, 2003).

O diagnóstico da doença requer testes de laboratório, pois dependendo do grau de virulência do vírus envolvido, o quadro clínico pode variar em intensidade (TIMURKAAN et al., 2003). Além disso, muitos sinais clínicos e lesões produzidas pelo VLTl também são causados por outros agentes patógenos respiratórios.

Somente nos casos de infecção aguda com alta mortalidade e expectoração de sangue, a doença pode ser diagnosticada baseado apenas no quadro clínico e no histórico do lote, mas o diagnóstico laboratorial é requerido para a doença branda (ABBAS; ANDREASEN, 1996). O diagnóstico laboratorial inclui técnicas histopatológicas, isolamento viral, detecção de antígenos, detecção de anticorpos e detecção de DNA (HUGHES; JONES, 1998).

A histopatologia continua sendo utilizada como método rápido de diagnóstico, e é baseada na observação de sincícios no epitélio traqueal, com corpúsculos de inclusão intranuclear (CI), necrose e hemorragia. Os CI podem ser observados nos primeiros cinco dias da infecção, mas desaparecem com a evolução da infecção, como resultado da necrose e descamação das células epiteliais (GUY; BAGUST, 2003).

A microscopia eletrônica direta do exsudato traqueal pode ser usada como um rápido método para a demonstração de partículas de herpesvirus em amostras de campo (HUGHES; JONES, 1988; WILLIAMS, SAVAGE; JONES, 1994).

O VLTi pode ser isolado em embriões de galinha livre de patógenos específicos (SPF), em células de cultura primária e em células de linhagem, a partir de amostras e exsudatos de traquéia, faringe e conjuntiva (SCHOLZ; PORTER; GUO, 1994). O vírus pode ser isolado em ovos embrionados de galinha inoculados por via membrana corioalantóide, onde produz placas opacas como consequência de necrose e proliferação viral. O VLTi multiplica-se em cultura primária de células de rim e fígado de embrião, células de rim de frango e em células tumorais de fígado (HUGHES et al., 1991; SCHNITZLEIN; RADZEVICIUS; TRIPATHY, 1994). A comparação dos títulos virais obtidos destes diferentes sistemas indica que as células de fígado de embrião produzem os maiores títulos virais (HUGHES; JONES,

1988). Embora o isolamento viral apresente uma alta sensibilidade, os efeitos citopáticos causados pela replicação viral no sistema *in vitro* podem demorar até quatro semanas para serem observados (HUGHES et al., 1988). Por isso, provas mais rápidas para a detecção do vírus são usualmente utilizadas em combinação com o isolamento viral, para acelerar o diagnóstico da doença (HUMBERD et al., 2002). Contudo, o isolamento viral ainda é requerido quando os resultados dos testes rápidos não são conclusivos (HUGHES; JONES, 1988).

Dentre as técnicas que detectam o antígeno viral encontram-se a imunodifusão em gel de ágar, que apresenta baixa sensibilidade analítica; a imunofluorescência (IF) com anticorpos policlonais, que é utilizada para a detecção do antígeno viral em amostras de traquéia e conjuntiva entre o sexto a oitavo dia PI, e embora seja uma prova rápida, tem a desvantagem de apresentar muitas reações inespecíficas. A técnica de imunoperoxidase (IP) com anticorpos monoclonais mostra-se mais simples, rápida e sensível que a IF, além de preservar a estrutura histológica, porém com baixa especificidade (TIMURKAAN et al., 2003). Em tanto, o ensaio imunoenzimático direto (ELISA direto) mostrou-se mais eficiente que a IF na detecção do antígeno do VLTl (ABBAS; ANDREASEN, 1996; GOODWIN et al., 1991; GUY; BARNES; SMITH, 1992).

As técnicas utilizadas para a detecção de anticorpos contra o VLTl incluem imunodifusão em gel de ágar, soroneutralização viral, imunofluorescência indireta (IFI) e ELISA indireto. Diferentes estudos demonstraram que estas técnicas eram válidas para a detecção e quantificação de anticorpos contra o VLTl, apesar de pouca praticidade. Embora, as técnicas de ELISA e IFI sejam mais rápidas e tenham maior sensibilidade, comparando as duas técnicas, o ELISA indireto tem a vantagem de ser quantitativo. Os testes de ELISA são utilizados como prova de triagem por

serem práticos, rápidos, de fácil aplicação e necessitarem poucas quantidades de soro e antígeno (BAUER; LOHR; KALETA, 1999; SANDER; THAYER, 1997).

A técnica de hibridação de DNA utilizando sondas de DNA mostrou alta sensibilidade analítica para a detecção do VLTl, a partir de aves com infecção aguda e persistente. Não entanto, a extração e purificação de DNA são necessárias, tornando a técnica trabalhosa (ABBAS; ANDREASEN, 1996; ABBAS; ANDREASEN; JACKWOOD, 1996; KEY et al., 1994; WILLIAMS; SAVAGE; JONES, 1994).

As deficiências das técnicas anteriormente citadas incluindo demora na obtenção de resultados ou falta de especificidade, despertou interesse no desenvolvimento de técnicas de detecção mais rápidas e específicas como a reação em cadeia da polimerase (PCR).

A PCR tem sido utilizada com êxito na detecção de DNA do VLTl a partir de traquéia e de outros órgãos como conjuntiva e gânglios trigêmeos, mostrando-se um método altamente sensível e específico (ABBAS; ANDREASEN; JACKWOOD, 1996; ALEXANDER; KEY; NAGY, 1998; ALEXANDER; NAGY, 1997; WILLIAMS et al., 1992a). O estudo conduzido por Williams, Savage e Jones (1994) evidenciou, pela primeira vez, que a PCR era mais sensível que o isolamento viral na detecção do VLTl, pois se mostrou eficiente na detecção do VLTl em gânglio trigêmeo quando seu isolamento não foi conseguido. Assim, a PCR pode detectar o VLTl em aves tanto com infecção aguda como com infecção latente (ABBAS; ANDREASEN; JACKWOOD, 1996). Vogtlin, Bruckner e Ottiger (1999) aplicaram a PCR na detecção do VLTl em vacinas inativadas, demonstrando que a PCR pode ser utilizada nos sistemas de controle de qualidade de produtos imunológicos na detecção de contaminações.

Evitar o contato de aves susceptíveis com aves infectadas (com infecção aguda ou persistente), ou com fômites contaminados representam importantes medidas de biosegurança. Mas, em casos de surtos da doença, as medidas de controle têm que incluir um diagnóstico rápido, o estabelecimento de um programa vacinal e a prevenção da disseminação de vírus. A lenta difusão do VLTl entre granjas permite que a vacinação seja feita no início do surto. Isto reduz as perdas iniciais nas granjas afetadas e permite o estabelecimento de uma área de controle ao redor das granjas infectadas (KEY et al., 1994).

Na atualidade, a medida mais efetiva de prevenção da doença é evitar a entrada do vírus através de medidas de biosegurança, sendo o uso de vacinas restrito a áreas onde a doença é endêmica, pois a vacinação pode originar portadores, fonte persistente de infecção. Apesar do uso das vacinas, a doença continua causando enormes perdas à avicultura mundial e particularmente em áreas de alta densidade populacional (CLAVIJO; NAGY, 1997; GARCIA; RIBLET, 2001).

As infecções por VLTl usualmente limitam-se ao trato respiratório superior das aves e parecem não produzir viremia. Além disso, a resposta imune humoral, incluindo anticorpos maternos, IgA secretora, e anticorpos neutralizantes não impedem a infecção e a doença (ANDREASEN et al., 1989; BAUER; LOHR; KALETA, 1999). Ao contrario, a proteção parece ser mediada por resposta imune celular (FAHEY; YORK 1990). Estes pontos são importantes ao considerar a estratégia de vacinação. Assim, a vacina deve estimular resposta imune de mucosa, mediada por células, que seja protetora (HIDALGO, 2003).

Para o controle da doença são utilizadas vacinas vivas atenuadas por passagem em ovos embrionados ou por passagem em cultura celular (GARCIA; RIBLET, 2001). As vacinas originadas em embrião de galinha são mais eficazes

oferecendo proteção ao desafio, mas muitas vezes produzem reações pós-vacinais indesejáveis. As vacinas originadas em cultura celular são mais atenuadas e menos imunogênicas, portanto oferecem menor proteção ao desafio. Estas vacinas podem ser administradas por água de bebida, via ocular ou por spray, mais a aplicação via ocular parece oferecer melhor proteção (GRAHAM et al., 2000).

Demonstrou-se que as vacinas vivas modificadas, produzidas tanto em embrião de galinha como em cultura celular, eram eficientes no desenvolvimento de resistência em populações susceptíveis, protegendo as aves contra a doença clínica e diminuindo as perdas econômicas (VOGTLIN, BRUCKNER; OTTIGER, 1999). No entanto, as vacinas usadas comercialmente têm apresentado vários efeitos adversos como a disseminação do vírus vacinal às aves não vacinadas, insuficiente atenuação viral, produção de aves portadoras com infecção latente (o que contribui à permanência do vírus nas populações aviárias), e incremento da virulência como resultado da passagem *in vivo* (ave a ave) (ANDREASEN et al., 1989; CHANG et al., 1997; GARCIA; RIBLET, 2001; GUY; BARNES; MORGAN, 1990; GUY et al., 1989; HAN; KIM, 2001a; HAN; KIM, 2003). Por outro lado, resultados obtidos no campo indicam que surtos em granjas vacinadas foram causados por falta de uniformidade na imunidade do grupo devido à vacinação com baixo título vacinal (GARCIA; RIBLET, 2001).

Estudos epidemiológicos e de patogenicidade indicaram que as cepas vacinais procedentes de embrião de galinha são uma possível fonte de surto, pois vírus isolados em casos clínicos da doença não apresentaram diferenças distinguíveis nos padrões de restrição quando comparadas com os padrões das vacinas (ANDREASEN; GLISSON; VILLEGAS, 1990; CHANG et al., 1997; GARCIA; RIBLET, 2001; GRAHAM et al., 2000; GUY et al., 1989; HAM; KIM, 2001a; KEELER

et al., 1993; KELLER et al., 1992). O aumento da virulência demonstrado depois da passagem *in vivo* e os padrões de restrição encontrados em diferentes trabalhos sugeriram que muitos surtos podem ter sido originados por mutações das cepas vacinais com aumento da virulência (GUY; BARNES; SMITH, 1991; KELLER et al., 1992). Keeler et al. (1993), encontraram grande divergência entre antigas cepas de referência e cepas vacinais quando comparadas com as cepas isoladas em surtos de Pennsylvania, sugerindo que os surtos poderiam ter ocorrido por mutações das vacinas propagadas em embrião, depois de passagens *in vivo*.

Mais recentemente, uma nova metodologia que combina a PCR seguido pela RFLP vem sendo usada em estudos que viram achar a origem de surtos da laringotraqueíte. Esta metodologia é rápida e aumenta a sensibilidade da reação, sendo muito favorável quando se tem baixa quantidade de DNA, como nos casos de infecção latente (CHANG et al., 1997; CLAVIJO; NAGY, 1997; GARCIA; RIBLET, 2001; GRAHAM et al., 2000; HANG; KIM, 2003).

Vacinas de subunidades recombinantes estão sendo desenvolvidas usando o vírus da doença de Marek e o Poxvirus como vetores para inserção de genes do VLTl. Outras vacinas com vírus atenuados da LTI estão sendo produzidas e consistem de vírus mutantes com deleção de genes como o da timidina kinase, e da glicoproteína C (KEELER, 2003; TONG et al., 2001). Nestes casos, o objetivo é a produção de vacinas que confirmem proteção ao desafio, mas que não produzam aves portadoras. Além disso, a aplicação desta tecnologia tem que oferecer um razoável custo/benefício para que seja aceita pela avicultura comercial.

A doença de Newcastle (NC) é uma das mais importantes doenças virais nas aves, devido a seu impacto econômico na indústria avícola mundial. A doença é altamente transmissível, afeta aves domésticas e silvestres onde produz alterações

digestivas, respiratórias, nervosas, baixo desempenho produtivo, diminuição na produção de ovos e alta mortalidade. O vírus da doença de NC (VNC) tem sido classificado na ordem *Mononegavirales*, família *Paramyxoviridae*, subfamília *Paramyxovirinae*, gênero *Avulavirus*. O VNC é um vírus sem envelope, com RNA de cadeia simples de sentido negativo (ALEXANDER, 2003; MAYO, 2002). Dependendo do vírus envolvido, o quadro clínico e a intensidade da doença pode variar muito. Clinicamente, os isolados podem ser classificados como: (1) cepas lentogênicas, que apresentam baixa virulência e causam uma suave ou inaparente infecção respiratória ou entérica, (2) isolados mesogênicos que geralmente causam sinais nervosos ou respiratórios, mais não mortalidade, e (3) isolados altamente virulentos, chamados de velogênicos, os quais produzem alta mortalidade. As cepas velogênicas podem ser divididas em neurotrópicos ou viscerotrópicos dependendo dos sinais clínicos e das lesões associadas com a infecção (KAPCZYNSKI; TUMPEY, 2003). As técnicas de soroneutralização, precipitação em gel de ágar, imunodifusão e ELISA são usadas na detecção de anticorpos, mas estas técnicas oferecem pouca informação sobre o vírus infectante, portanto, têm baixo valor diagnóstico. O isolamento viral constitui hoje, o único método indiscutível para o diagnóstico da doença, permitindo a caracterização do vírus infectante (ALDOUS; ALEXANDER, 2001; ALEXANDER, 2003). A PCR pode ser efetuada usando *primers* que simplesmente identificam o VNC ou sua presença, *primers* que amplifiquem segmentos do genoma relacionados com propriedades específicas (patotipos), ou *primers* que permitam a identificação viral e as propriedades específicas (GOHM; THUR; HOFMANN, 2000).

A bronquite infecciosa das galinhas (BIG) é uma doença aguda e altamente transmissível do trato respiratório superior das aves. O agente causal, o vírus da

bronquite infecciosa (VBIG), é membro da família *Coronaviridae*. O genoma do VBIG apresenta-se como RNA de fita simples e de sentido positivo e na superfície do envelope o vírus possui projeções à maneira de espículas. Os sinais clínicos incluem estertores traqueais, exsudatos nasais e espirro. A doença também pode afetar os sistemas reprodutivo e renal. A BIG é de importância econômica porque causa diminuição no ganho de peso em frangos e diminuição da produção e qualidade dos ovos em poedeiras (CAVANAGH; NAQI, 2003). A doença tem sido controlada com vacinas específicas para o sorotipo de interesse. Não obstante, surtos da doença podem ocorrer devido às vacinas oferecerem baixa ou falta de proteção entre vírus de sorotipos distintos. A alta frequência de mutações e recombinação de RNA leva ao aparecimento de novos vírus capazes de causar doença em aves imunizadas (CALLISON; JACKWOOD; HILT, 2001; KOTTIER; CAVANAGH; BRITTON, 1995). O VBIG pode ser diagnosticado por isolamento viral em ovos embrionados ou testes sorológicos, mas estes testes são muito trabalhosos. A PCR usando *primers* que amplificam o gene codificador da proteína de espícula S é utilizada para estudos de caracterização e epidemiologia molecular. Mas, utilizando *primers* dirigidos a regiões conservadas, a PCR permite a rápida detecção de pequenas quantidades do vírus (KWON et al., 1993).

O pneumovírus aviário (VPA) é um vírus RNA de fita única e de sentido negativo, membro do gênero *Metapneumovirus* na família *Paramixoviridae* (ALEXANDER, 2003). O vírus causa rinotraqueíte, uma infecção aguda do trato respiratório superior, com descarga nasal, estertores traqueais, conjuntivite espumosa e sinusite em frangos e perus. Porém, os sinais clínicos parecem ser mais brandos em frangos (GOUGH, 1994). Em aves de postura comercial, produz uma queda transitória na postura de ovos juntamente com uma doença branda do trato

respiratório. Não existindo complicações, a infecção pelo VPA causa baixa taxa de mortalidade (2 – 5%). As infecções pelo VPA são diagnosticadas pela detecção do vírus, ácido nucléico em tecidos de aves infectadas, ou pela detecção de anticorpos específicos (CHARY et al., 2002; JING et al., 1993; JIRJIS et al., 2000).

O *Mycoplasma gallisepticum* (MG) causa infecção respiratória em frangos e perus. A doença é comumente observada em galinhas de postura comercial, principalmente em granjas de múltiplas idades, ocasionando grande impacto econômico. As perdas são ocasionadas pela pobre conversão alimentar, diminuição na produção de ovos, aumento da mortalidade embrionária, redução da taxa de eclosão e condenações no abate (LEY, 2003). O MG é transmitido horizontalmente por aves infectadas, fômites ou por aerossóis. Quando o epitélio respiratório é colonizado por cepas virulentas, as aves apresentam inflamação dos seios infraorbitários, conjuntivite com excessivo lacrimejamento, aerocasulite, dispnéia e anorexia e perdas na produção de ovos, podendo ocorrer mortalidade em até 30%. A intensidade da infecção pode ser aumentada pela associação com outras infecções virais ou bacterianas, condição conhecida como doença respiratória crônica (KLEVEN, 1998). O diagnóstico do MG tradicionalmente tem sido realizado por sorologia ou isolamento e identificação. Contudo, os testes de diagnóstico sorológico nem sempre oferecem resultados conclusivos devido à falta de sensibilidade ou especificidade (RADI et al., 2000; YODER, 1989) e o isolamento de MG nem sempre é possível, pois MG é um dos micoplasmas aviários de maior dificuldade no crescimento em meio artificial. Nos últimos anos, a PCR com alta sensibilidade e especificidade na detecção do MG tem sido eficientemente utilizada em laboratórios de diagnóstico (NASCIMENTO et al., 1991).

O *Mycoplasma synoviae* (MS), causa sinovite e problemas respiratórios em galinhas de postura comercial e perus. Consideráveis perdas econômicas podem ocorrer como consequência de infecções com este microrganismo, devido às condenações por aerossaculite, assim como, pelo atraso no crescimento do lote e na diminuição da produção de ovos quando se associa com outros agentes. Embora alguns isolados do MS podem causar sinais clínicos, muitos isolados causam infecções subclínicas, uma característica que dificulta o manejo e o controle dos surtos (KLEVEN, 2003). O diagnóstico é realizado frequentemente por procedimentos sorológicos, mas as reações inespecíficas destes testes limitam a detecção de MS (ORTIZ; KLEVEN, 1992). O isolamento pode ser usado para confirmar os resultados sorológicos, mas este método requer de muita experiência, e, devido às contaminações bacterianas e por infecções mistas com outros micoplasmas, o resultado pode ser obtido até em três semanas. A PCR demonstrou ser altamente específica, rápida e sensível para o diagnóstico de micoplasmas (NASCIMENTO et al., 1991). Além de superar os problemas relacionados ao cultivo e identificação, a PCR pode detectar cepas vacinais, distinguindo-as dos isolados de campo (GARCIA et al., 1995; NASCIMENTO; YAMAMOTO; KHAN, 1993; ZHAO; YAMAMOTO, 1993).

3 OBJETIVOS

- Desenhar e avaliar o desempenho de *primers* dirigidos a uma região conservada do gene codificador da glicoproteína E (gE) do VLTl para as reações de PCR e *nested*-PCR.
- Padronizar e avaliar as reações de PCR e *nested*-PCR para a detecção do DNA do VLTl em amostras isoladas e de campo, adotando o isolamento viral em ovos embrionados de galinha SPF como prova de referência.
- Detectar pela técnica de *nested*-PCR padronizada o VLTl em amostras de poedeiras comerciais procedentes de uma região de produção intensiva que apresentou um surto caracterizado por distúrbios respiratórios, queda na produção de ovos e alta mortalidade (região de Bastos – Estado de São Paulo).
- Isolar o VLTl em ovos embrionados de galinhas SPF a partir de amostras de campo procedentes da região de Bastos, Estado de São Paulo.
- Caracterizar através de seqüenciamento de DNA o VLTl detectado e isolado.
- Avaliar o papel do VLTl no surto de doença respiratória através de sua ocorrência e o diagnóstico diferencial com outros agentes.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 LOCALIZAÇÃO

O presente estudo foi realizado com amostras de órgãos de aves procedentes de granjas de postura comercial localizadas na região de Bastos, Estado de São Paulo. Esta região, que é responsável por mais de 30% da produção de ovos do Estado de São Paulo e 15% da produção nacional, é caracterizada por criações intensivas com variados níveis de biosegurança, alta densidade populacional de aves e galpões de múltiplas idades (SAGESSE, 2005).

4.2 HISTÓRICO

No final de 2002 e no início do 2003, apresentou-se na região de Bastos um surto caracterizado por sinais respiratórios agudos, que levaram à queda na produção de ovos e alta mortalidade. Os sinais clínicos observados (depressão, dispnéia, espirros, descarga nasal, conjuntivite, expectoração de secreção sanguinolenta), assim como as lesões encontradas na necrópsia (lesões diftéricas e hemorragia na luz traqueal) sugeriam a doença laringotraqueíte infecciosa. Junto com as amostras recebidas foram proporcionadas informações técnicas e sanitárias de cada granja incluída no estudo (Quadro 7).

4.3 AMOSTRAS DE CAMPO

Amostras de 51 granjas comerciais da região acometida pela doença foram coletadas e enviadas pela Secretaria de Agricultura do Estado de São Paulo ao Laboratório de Ornitopatologia (FMVZ-USP) como parte de um convênio para um estudo epidemiológico desta região. Foram incluídas na amostragem granjas que apresentaram aumento na mortalidade e sinais clínicos suspeitos da doença e granjas sem nenhuma sintomatologia.

Foram processadas amostras de traquéia, pulmão e conjuntiva, realizando-se um “pool” de cada órgão contendo amostras de oito aves de cada granja por separado.

A identificação das amostras (número de ficha laboratorial), idade e os quadros clínicos associados encontram-se no quadro 7.

4.4 AMOSTRAS PADRÕES

Utilizou-se um vírus padrão da LTI como controle positivo em todas as reações em cadeia da polimerase (*nested*-PCR) para a detecção do DNA do vírus da laringotraqueíte infecciosa. Este vírus foi isolado em ovos embrionados de galinhas SPF e fornecido pelo Laboratório de Referência da Secretaria de agricultura do Estado de São Paulo (LARA), Campinas - São Paulo.

Para o diagnóstico diferencial utilizaram-se as seguintes amostras como controle positivo: cepa vacinal Clone 30 Tipo La Sota (doença de Newcastle), cepa vacinal Holland H120 (bronquite infecciosa das galinhas), cepa vacinal RTV 8544 (pneumovirose aviária), cepa vacinal GM 129 S-6 (*Mycoplasma gallisepticum*) e cepa vacinal MS-H (*Mycoplasma synoviae*). Como controle negativo foi utilizado PBS 0,01M, pH 7,2 em toda as reações.

4.5 EXTRAÇÃO DE DNA

A extração de DNA para a detecção do VLT1, MG e MS para as amostras de campo, amostras padrão e o controle negativo (água ultra-pura) seguiu o seguinte protocolo descrito por Chomkczynski et al. (1993):

- a. “Pools” de amostras de conjuntiva, traquéia e pulmão das 51 granjas foram maceradas separadamente e diluídas a 20% em solução salina fosfatada (PBS), 0,01 M, pH 7,2.
- b. A suspensão foi centrifugada a 12.000 x g/ 20 minutos/ 4°C.
- c. O volume de 200 µl do sobrenadante das amostras foi homogeneizado com 600 µl de Tiocianato de Guanidina – fenol pH 7,5 em proporção 1:1 (v:v).
- d. As amostras foram homogeneizadas em vórtex por 15 segundos.
- e. Adicionaram-se 100 µl de clorofórmio e as amostras foram novamente homogenizadas em vórtex por 15 segundos.
- f. As amostras foram centrifugadas a 12.000 x g por 5 minutos a 4°C.

- g. O sobrenadante (+/- 400 µl) foi transferido para outro tubo contendo 600 µl de propanol, homogeneizando em vórtex por 15 segundos.
- h. A seguir, as amostras foram levadas a - 20 °C por 2 horas, centrifugadas a 12.000 g por 20 minutos a 4°C, sendo o sobrenadante descartado.
- i. O “pellet” foi ressuspensão em 500 µl de etanol a 70%.
- j. As amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 20 minutos a 4°C, sendo o sobrenadante descartado.
- k. Os tubos foram colocados em banho seco a 56 ° C por 15 minutos, após este período adicionou-se 30 µl de Tris-EDTA pH 8,0, e as amostras foram colocadas a 56 ° C por 15 minutos.

4.6 EXTRAÇÃO DE RNA

A extração de RNA das amostras de traquéia, pulmão e conjuntiva das 51 granjas para a detecção dos vírus das doenças de Newcastle, bronquite infecciosa e Pneumovírose aviária para as amostras de campo, amostras padrão e o controle negativo (água ultra-pura) foi realizada segundo o seguinte protocolo:

- a. As amostras de cada órgão foram maceradas e ressuspensas a 20 % em PBS 0,01 M., pH 7,2.
- b. As suspensões foram centrifugadas a 12.000 x g por 30 minutos a 4 °C.
- c. Ao sobrenadante, foi aplicado o protocolo de extração do TRIzol (Invitrogen™) conforme instruções do fabricante.

4.7 PADRONIZAÇÃO DE UMA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) PARA DETECÇÃO DO VIRUS DA LARINGOTRAQUEITE INFECCIOSA (VLTi)

4.7.1 Desenho e síntese dos *Primers*

Foi padronizada uma reação de *nested*-PCR para a detecção de um segmento de 219 pb do gene codificador da glicoproteína E, conservada e localizada na região curta única (US).

Os *primers* foram desenhados a partir de uma sequência completa do gene E do VLTi publicada no Genbank (número de acesso: NC-006623). As sequências foram alinhadas pelo programa Bioedit v. 5.0.9 (© 1997-2001 Tom Hall) e os *primers* foram desenhados com o auxílio do programa Oligo (© 1999-2003 Molecular Biology Insights, Inc.), obtendo-se um par de *primers* externos denominados de GE1S (*primer* senso) e GE2AS (*primer* antisenso), com um produto esperado de 524 pb. Os *primers* GE3S (*primer* senso) e GE4AS (*primer* antisenso) internos ao segmento de 524 pb previsto foram desenhados para amplificar um produto de 219 pb (Quadro 1). Os *primers* foram submetidos a BLAST/n para busca por sequências não relacionadas à região a ser amplificada.

Nas duas amplificações, a amostra de VLTi isolada e proporcionada pelo Laboratório de Referência da Secretaria de Agricultura do Estado de São Paulo foi usada como controle positivo e PBS 0,01 M, pH 7,2 foi usada como controle negativo; ainda, na reação *nested*, foi incluído um tubo com água ultra-pura a cada cinco amostras, processado em conjunto com estas, com o intuito de se monitorarem contaminações por DNA amplificado.

PRIMERS	SEQUÊNCIA	FRAGMENTO AMPLIFICADO
GE1S	5' CGTATACCATCCTACAGACGGCA 3'	524 pb
GE2AS	5' CGTACAATGGTTCGGTCTTGGA 3'	
GE3S	5' AGTCCTCTTATAGCCATCCCCA 3'	219 pb
GE4AS	5' CACCCCCGCGACGACGAAGT 3'	

Quadro 1 - *Primers* usados para a detecção do gene codificador da glicoproteína E

4.7.2 Amplificação

Primeira amplificação. Cinco microlitros (5 µL) de DNA extraído foram adicionados ao PCR *mix* [1x PCR Buffer (InvitrogenTM), 0,2 mM de cada dNTP, 0,5 pmol/µL de cada *primer* (GE1S e GE2AS), 1,5 mM de MgCl₂, 25,25 µL de água ultra-pura e 1,25 U de Taq DNA polimerase], para uma reação final de 50 µL e submetidos a 40 ciclos de 94°C por um minuto para a desnaturação do DNA, 58°C por um minuto para a hibridação dos *primers* e 72°C por dois minutos para a extensão do DNA e, seguido de 72°C por dez minutos para a extensão final.

Segunda amplificação. A fase de *nested*-PCR foi realizada com 5 µL do produto da primeira amplificação adicionados ao *mix* contendo [1x PCR Buffer (InvitrogenTM), 0,2 mM de cada dNTP, 0,5 pmol/µL de cada *primer* (GE3S e GE4AS), 1,5 mM de MgCl₂, 25,25 µL de água ultra-pura e 1,25 U de Taq DNA polimerase] para uma reação final de 50 µL e submetidos a 40 ciclos de 94°C por um minuto, 58°C por um

minuto (temperatura encontrada como ótima para este par de *primers*) e 72°C por dois minutos, seguidos por 72°C por dez minutos para a extensão final.

4.7.3 Detecção do produto amplificado

O sistema de análise dos fragmentos amplificados foi conduzido através de eletroforese em cuba horizontal, em gel de agarose a 1,5% imerso em tampão Tris-Borato-EDTA (0,045 M de Tris-Borato, 1 mM de EDTA) e a uma voltagem adequada às dimensões do gel (1 a 10 V/cm de gel).

A visualização dos fragmentos amplificados foi feita através de transiluminação do gel em luz ultravioleta, após ser submetido durante aproximadamente 15 minutos a uma solução de brometo de etídio a uma concentração final de 0,5 µg/mL. As dimensões dos fragmentos amplificados foram comparadas a um padrão de tamanho molecular (100 pares de base) disposto no gel juntamente com as amostras analisadas, a cada corrida eletroforética.

4.7.4 Sensibilidade e especificidade analítica técnica de *nested*-PCR

Para estabelecer o limiar de detecção do DNA da reação de *nested*-PCR padronizada (sensibilidade analítica), foi usado o DNA extraído da amostra padrão do VLTI. Diluições sucessivas do DNA extraído da amostra padrão, no fator dez,

foram realizadas em água ultrapura estéril, sendo realizadas diluições de 10^{-1} até 10^{-10} . As amostras foram agitadas entre cada diluição para promover uma melhor homogeneização. O DNA diluído foi quantificado em um espectrofotômetro Bio Photometer v. 1.32 com um comprimento de onda (absorbância) de 260 nm.

Para avaliar a especificidade dos *primers* utilizados na reação de *nested*-PCR, DNA extraído do vírus da laringotraqueíte infecciosa, *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae*, e RNA extraído a partir de amostras vacinais dos agentes etiológicos das doenças de Newcastle, bronquite infecciosa das galinhas e pneumovirose aviária foram submetidas à reação de PCR utilizando os primers (GES1, GEAS2, GES3 e GEAS4) e as condições de reação descritas no item 4.7.2.

4.7.5 Seqüenciamento de DNA

O fragmento correspondente ao gene codificador da glicoproteína E (219 pb) de uma amostra (amostra 15), obtido conforme os itens 4.7.2, foi purificado do géil de agarose com o *kit* GFXTM (Amersham), quantificado visualmente com Low Mass DNA Ladder (InvitrogenTM) de acordo com as instruções do fabricante e submetido ao seqüenciamento de DNA em seqüenciador automático MEGABACE (Amersham BiosciencesTM).

A reação de seqüenciamento foi realizada bidirecionalmente com DYEnamic ET Terminator reagent (Amersham BiosciencesTM) de acordo com as instruções do fabricante e 5 μ M de cada *primer* em reações separadas em termociclador para 30

ciclos de 95°C por 15 segundos, 50°C por 20 segundos e 60°C por 1 minuto, com rampa de 0,7°C por segundo entre cada temperatura.

A seguir, o produto desta reação foi precipitado com 80 µL de isopropanol a 75% à temperatura ambiente e após um período de incubação de 20 minutos foi centrifugada a 12.000 x g por 25 minutos. O sobrenadante foi removido, adicionou-se 250 µL de etanol 70%, centrifugou-se a 12.000 x g por 5 minutos e o precipitado foi secado a 90°C.

Os cromatogramas gerados para as seqüências senso e antisenso da amostra seqüenciada foram conferidos manualmente com o programa Chromas v. 2.23 (© 1998-2002 Technelysium Pty LTD) para a busca de erros de interpretação e discrepâncias entre cada uma das fitas seqüenciadas. A seqüência consenso final da amostra foi obtida a partir das seqüências senso e o reverso-complemento da anti-senso alinhada com o programa Bioedit v. 5.0.9 (© 1997-2001 Tom Hall), sendo a mesma submetida ao BLASTn para confirmação da identidade do fragmento seqüenciamento.

A confirmação da identidade do fragmento amplificado foi realizada através de alinhamento e comparação das seqüências consensuais da amostra seqüenciada e da única seqüência homóloga recuperada do GenBank: U28832.1, conferindo-se manualmente o alinhamento. A identidade entre as seqüências alinhadas foi calculada com o programa Bioedit.

4.8 DETECÇÃO DO VLTl EM AMOSTRAS DE CAMPO POR PCR

As técnicas de PCR e *nested*-PCR tiveram seu desempenho avaliado na detecção do VLTl em amostras clínicas. As amostras (“*pools*”) de traquéia, pulmão e conjuntiva de cada uma das 51 granjas, após cada uma delas serem submetidas separadamente à extração de DNA, foram amplificadas com os *primers* GES1 e GEAS2, conforme ao item 4.7.2. Uma alíquota do produto desta amplificação (5 µl) foi amplificada novamente com auxílio dos *primers* GES3 e GEAS4 (*nested*-PCR) (item 4.7.2).

4.9 ISOLAMENTO DO VIRUS DA LARINGOTRAQUEITE INFECCIOSA EM OVOS EMBRIONADOS SPF

Amostras das 51 granjas foram inoculadas em ovos embrionados de galinhas SPF com 9 a 10 dias de idade a través da membrana corioalantóide (MCA), na tentativa de isolamento do VLTl. O inóculo foi preparado da seguinte forma:

- a. Um “*pool*” de macerado de conjuntiva, traquéia e pulmão, de cada granja, foi diluído em 500 µL de PBS 0,01 M., pH 7,2.
- b. A suspensão foi centrifugada a 12.000 x g por 20 minutos a 4°C.
- c. No mínimo 3 ml do sobrenadante foi filtrado em filtro 0,2 µm de diâmetro (Milipore®) e 30 µL de gentamicina a 1 mg/mL foram adicionados ao inóculo.

- d. Foram inoculados 0,2 µl de cada amostra, via MCA em cinco ovos embrionados com 9 a 10 dias de idade, incubados a 37⁰C.
- e. Os ovos foram observados sob ovoscopia, duas vezes ao dia, durante 5 dias para a detecção de mortalidade. Os ovos que apresentaram morte embrionária nas primeiras 24 horas foram eliminados.
- f. No quinto dia pós-inoculação (PI) as MCA foram colhidas.
- g. As MCA colhidas foram suspensas em PBS 0,01 M., 7,2 pH, maceradas, filtradas e tratadas com antibiótico como detalhado nos Itens a-c e 0,2 µl desta passagem foram inoculados como descrito no item d, num total de 5 passagens.
- h. Após cada passagem, os ovos inoculados eram testados para a presença do VLT1 pela técnica da *nested*-PCR através da amplificação do gene E (Item. 4.7.2).

4.10 DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

4.10.1 Detecção do vírus da doença de Newcastle

Para a detecção do vírus da doença de Newcastle foi utilizada uma técnica de RT-PCR para a observação de um segmento de 324 pb do gene codificador da proteína de fusão. Foram utilizados os *primers* NEWS e NEWA e as condições descritas por Pang et al. (2002) (Quadro 2).

PRIMER	SEQUÊNCIA	FRAGMENTO AMPLIFICADO
NEWS	5' GGA GGA TGT TGG CAG CAT T 3'	324 pb
NEWA	5' GTC AAC ATA TAC ACC TCA TC 3'	

Quadro 2 - *Primers* usados para a detecção do gene codificador da proteína de fusão do vírus da doença de Newcastle

Síntese de c-DNA (Transcrição reversa). Foi realizada a 42°C por 60 minutos adicionando 7 µl do RNA extraído e desnaturado a 95°C por 5 minutos em um *mix* contendo [1 x first Strand Buffer (Invitrogen™), 1 mM de cada dNTP, 10 mM de DTT, 1 pmol/µl de cada *primer* (NEWS e NEWA), e 200 U de M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen™)], para uma reação final de 20 µl.

Amplificação (PCR). A seguir 5 µl de cDNA assim obtido foram adicionados ao PCR *mix* [1x PCR Buffer (Invitrogen™), 0,2 mM de cada dNTP, 0,5 pmol/µl de cada *primer* (NEWS e NEWA), 1,5 mM de MgCl₂, 25,25 µl de água ultrapura e 1,25 U de Taq DNA polimerase], para uma reação final de 50 µl e submetidos a 30 ciclos de 94°C por um minuto, 56°C por um minuto e meio, 72°C por um minuto e seguido por 72°C por 10 minutos para a extensão final.

Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram a banda de 324 pb em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo 0,5 µg/mL.

4.10.2 Detecção do vírus da bronquite infecciosa das galinhas

Uma técnica de *nested*-RT-PCR dirigida à região 3' UTR do genoma do vírus da bronquite infecciosa foi empregada para a detecção deste vírus (CAVANAGH et al., 2002) (Quadro 3).

PRIMER	SEQUÊNCIA	FRAGMENTO AMPLIFICADO
UTR 41	5' ATGTCTATCGCCAGGGAAATGTC 3'	266 pb
UTR 11	5' GCTCTAACTCTATACTAGCCTA 3'	
UTR 31	5' GGGCGTCCAAGTGCTGTACCC 3'	179 pb

Quadro 3 - *Primers* usados para a detecção do gene codificador da região 3' UTR do genoma do vírus da bronquite infecciosa

Síntese de c-DNA. Foi desnaturado 7 µL do RNA extraído a 95 °C durante 5 minutos e adiciono-se ao *mix* de transcrição reversa contendo [1 x First Strand Buffer (InvitrogenTM), 1 mM de cada dNTP, 10 mM de DTT, 1 pmol/µL de cada *primer* (UTR41 e UTR11) e 200 U de M-MLV Reverse Transcriptase (InvitrogenTM)], para uma reação final de 20 µL, realizando-se a transcrição reversa a 42°C por 60 minutos.

Primeira amplificação. A seguir, 5 µL de cada c-DNA foram adicionados ao *mix* de PCR (1 x PCR *Buffer* (InvitrogenTM), 0.2mM de cada dNTP, 0,5 pmol/µL de cada *primer* (UTR41 e UTR11), 1,5 mM de MgCl₂, 25,25 µL água ultra-pura esterilizada e 1,25 U de Taq DNA polimerase (InvitrogenTM), para uma reação final de 50µL e submetidos a 35 ciclos de 94 °C por um minuto, 48 °C por um minuto e meio e 72 °C por dois minutos e seguidos por 72 °C por 10 minutos para extensão final.

Segunda amplificação. O volume de 5 µL do produto do PCR foram adicionados ao *mix* de *nested*-PCR [1 x PCR *Buffer* (InvitrogenTM), 0.2 mM de cada dNTP, 0,5 pmol/µL de cada *primer* (UTR41 e UTR31), 1,5 mM de MgCl₂, 25,25 µL água ultra-pura esterilizada e 1,25 U de Taq DNA polimerase (InvitrogenTM)], para uma reação final de 50 µL e submetidos a 35 ciclos de 94 °C por um minuto, 48 °C por um minuto e meio e 72 °C por dois minutos e seguidos por 72°C por 10 minutos para extensão final. Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram a banda de 179 pb em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo 0,5 µg/mL.

4.10.3 Detecção do Pneumovírus aviário

Foram utilizados os *primers* e as condições descritas por Cavanagh et al. (1999) para a detecção do Pneumovírus aviário tipos A e B através da técnica *nested*-RT-PCR (Quadro 4). Os *primers* utilizados amplificaram o gene codificador da glicoproteína G do Pneumovírus.

PRIMER	SEQUÊNCIA	FRAGMENTO AMPLIFICADO
G6-	5' CTG ACA AAT TGG TCC TGA TT 3'	444 pb
G1+	5' GGG ACA AGT ATC T/C C/A T/G AT 3'	
G5-	5' CAA AGA A/G CCA ATA AGC CCA 3'	--
G8+A	5' CAC TCA CTG TTA GCG TCA TA 3'	268 pb
G9+B	5' TAG TCC TCA AGC AAG TCC TC 3'	361 pb

Quadro 4 - *Primers* usados para a detecção do gene codificador da glicoproteína G do Pneumovírus aviário

Síntese de c-DNA. Sete microlitros do RNA extraído e foram desnaturados a 95°C durante 5 minutos e adicionado ao *mix* de transcrição reversa contendo [1 x First Strand Buffer (InvitrogenTM), 1 mM de cada dNTP, 10 mM de DTT, 1 pmol/μL de cada *primer* (G6- e G1+) e 200 U de M-MLV Reverse Transcriptase (InvitrogenTM)], para uma reação final de 20 μL, sendo realizada a transcrição reversa a 42°C por 60 minutos.

Primeira amplificação. O volume de 5 μL de cada c-DNA foram adicionados ao mix de PCR [1 x PCR Buffer (InvitrogenTM), 0.2 mM de cada dNTP, 0,5 pmol/μL de cada *primer* (G6- e G1+), 1,5 mM de MgCl₂, 25,25 μL água ultra-pura esterilizada e

1,25 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen™)], para uma reação final de 50 µL e submetidos a 35 ciclos de 94 °C por um minuto, 48 °C por um minuto e meio e 72 °C por dois minutos, e seguidos por 72 °C por dez minutos para extensão final.

Segunda amplificação. O produto da PCR (5 µL) foram adicionados ao *mix* de *nested-PCR* [1 x PCR Buffer (Invitrogen™), 0.2 mM de cada dNTP, 0,5 pmol/µL de cada *primer* (G5-, G8+A e G9+B), 1,5 mM de MgCl₂, 25,25 µL água ultra-pura esterilizada e 1,25 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen™)], para uma reação final de 50 µL e submetidos a 35 ciclos de 94 °C por um minuto, 48 °C por um minuto e meio e 72 °C por dois minutos, seguidos por 72°C por dez minutos para a extensão final.

Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram a banda de 361 pb (sorotipo A) ou 268 pb (sorotipo B) em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo 0,5 µg/mL.

4.10.4 Detecção de *Mycoplasma gallisepticum*

Mycoplasma gallisepticum (MG) foi pesquisado utilizando uma reação de PCR descrita por Nascimento et al. (1991) e com *primers* que amplificam uma banda de 732 pb (Quadro 5).

PRIMER	SEQUÊNCIA	FRAGMENTO AMPLIFICADO
MG-f	5' GGATCCCATCTCGACCACGAGAAAA 3'	732 pb
MG-r	5' CTTTCAATCAGTGAGTAACTGATGA 3'	

Quadro 5 - *Primers* usados para a detecção de *Mycoplasma gallisepticum*

PCR. A reação foi realizada em um volume final de 50 µL contendo 5 µL de DNA extraído, 5 µL de 10 X PCR buffer (10mM Tris-HCl (ph 8.3) e 50 mM KCl), 3,0 mM de MgCl₂, 2 µL com 0,4 mM de cada nucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 1,75 U de Taq DNA polimerase, 50 pmol de cada *primer* (MG-f e MG-r) e água ultra pura. O ciclo de amplificação foi 94⁰C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos de 94⁰C por um minuto, 55⁰C por um minuto e 72⁰C por dois minutos, com uma extensão final de 72⁰C por dez minutos.

Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram a banda de 732 pb em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo 0.5 µg/mL.

4.10.5 Detecção de *Mycoplasma synoviae*

Mycoplasma synoviae (MS) foi pesquisado através de uma reação de PCR descrita por Lauerman (1998) e com *primers* que amplificam uma banda de 207 pb (Quadro 6).

PRIMER	SEQUENCIA	FRAGMENTO AMPLIFICADO
MS-f	5' GAGAAGCAAAATAGTGATATCA 3'	207 pb
MS-r	5' CAGTCGTCTCCGAAGTTAACAA 3'	

Quadro 6 - *Primers* utilizados para a detecção de *Mycoplasma synoviae*

PCR. Cinco microlitros de DNA extraído foi adicionado a um *mix* contendo (5 µL de 10 X PCR *buffer* (10mM Tris-HCl (ph 8.3) e 50 mM KCl), 3,0 mM de MgCl₂, 2 µL com 0,4 mM de cada nucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 1,75 U de Taq DNA polimerase, 20 pmol de cada *primer* (MS-f e MS-r), completando com água ultra pura para um volume final de 50 µL. O ciclo de amplificação foi 94⁰C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos de 94⁰C por um minuto, 55⁰C por um minuto e 72⁰C por dois minutos, com uma extensão final de 72⁰C por dez minutos.

Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram a banda de 207 pb em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo 0.5 µg/mL.

5 RESULTADOS

5.1 PADRONIZAÇÃO DE UMA REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE PARA A DETECÇÃO DO VLTl

5.1.1 Desenho dos *primers*

A amplificação de um fragmento de 524 pb usando os *primers* externos (GE1S e GE2AS) e do fragmento de 219 pb usando os *primers* internos (GE3S e GE4AS), a partir do genoma do VLTl, evidencia que os *primers* desenhados resultaram nos fragmentos previstos e hibridaram nas regiões previstas.

5.1.2 Detecção do VLTl

As técnicas de PCR e *nested*-PCR desenvolvidas neste trabalho foram capazes de detectar o DNA do VLTl. O par de *primers* GE1S e GE2AS (PCR) produziu um fragmento de DNA de 524 pares de bases e o par de *primers* GE3S e GE4AS (*nested*-PCR) produziu um fragmento de 219 pb. Os produtos amplificados no PCR e *nested*-PCR foram detectados após eletroforese em gel de agarose, juntamente com um padrão de tamanho molecular (Figura 1).

Figura 1 - Eletroforese dos produtos *nested*-PCR correspondentes ao gene codificador da glicoproteína E do VLTl. Coluna A-E: amostras de campo; F: controle positivo; G: controle negativo; H: Padrão de peso molecular (100 pb GIBCO®)

5.1.3 Sensibilidade e especificidade analíticas

Através da diluição de DNA do VLTl, em série, na base dez verificou-se que o limite de detecção do *nested*-PCR padronizado estava entre 3 e 6 ng/μl de DNA.

A especificidade dos *primers* sintetizados para amplificação do VLTl foi testada com DNA do vírus da laringotraqueíte infecciosa (VLTl), *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae*, e também com o RNA dos vírus da doença de Newcastle, bronquite infecciosa, pneumovirose aviária. Além disso, a especificidade dos *primers* foi testada com DNA de traquéia e pulmão de aves clinicamente normais e membrana corioalantóide de embriões não infectados. Somente o DNA do VLTl amplificou o produto do *nested*-PCR esperado de 219 pb, sendo que nenhuma banda foi observada para os outros agentes.

5.1.4 Seqüenciamento de DNA

O seqüenciamento de DNA do produto do *nested*-PCR de uma amostra positiva resultou em uma seqüência de 200 nucleotídeos. Quando submetida ao BLASTn, esta seqüência resultou apenas em uma seqüência derivada do VLTl, sem outras seqüências de escore significativo. A seqüência obtida foi depositada no Genbank sob número de acesso DQ 223072.

A seqüência de 200 pb do gene que codifica a glicoproteína E (gene E) do VLTl obtida por seqüenciamento foi utilizada para confirmação de identidade por alinhamento e comparação com a única seqüência do gene E do VLTl publicada no Genbank. As seqüências foram alinhadas com o programa Bioedit v. 5.0.9 (Figura 2).

Quando calculada a identidade de nucleotídeos para a região de alinhamento, observou-se identidade entre as seqüências de 84,6%.

Figura 2 - Alinhamento de nucleotídeos de um segmento do gene codificador da glicoproteína E (gE) do vírus da laringotraqueíte infecciosa

5.2 DETECÇÃO DO VLTl EM AMOSTRAS DE CAMPO POR PCR

No estudo, foram empregadas amostras de 51 granjas de poedeiras comerciais coletadas e enviadas ao Laboratório de Ornitopatologia da FMVZ-USP durante o ano de 2003. Em 23 granjas foi detectado o VLTl depois que amostras de traquéia, pulmão e conjuntiva foram maceradas e submetidas à técnica de *nested*-PCR padronizada (item 4.7.2) (Figura 3).

Das 23 granjas positivas para LTI, 11 eram provenientes de granjas que apresentaram sinais clínicos respiratórios e/ou aumento da mortalidade no momento da colheita das amostras (Figura 4).

A figura 5 mostra os resultados do *nested*-PCR segundo o órgão pesquisado. O VLTl foi detectado em traquéia, pulmão e conjuntiva, em 18, 5 e 12 granjas, respectivamente. Somente em três granjas, o vírus foi detectado nos três órgãos processados neste estudo.

Figura 3 - Detecção do VLTI em amostras de granjas de poedeiras comerciais pela técnica de *nested-PCR*

Figura 4 - Detecção do VLTI em amostras de granjas de poedeiras comerciais pela técnica de *nested-PCR* segundo o histórico clínico

Figura 5 - Detecção do VLTi em amostras de granjas de poedeiras comerciais pela técnica de *nested*-PCR após análise de traquéia (T), pulmão (P) e conjuntiva (C)

5.3 ISOLAMENTO DO VLTi EM OVOS EMBRIONADOS SPF

Foram realizadas cinco passagens sucessivas em ovos embrionados de galinhas SPF de 8 a 9 dias de idade, inoculados por via membrana corioalantóide a partir de um “*pool*” de traquéia, pulmão e conjuntiva de cada granja (n=51). O vírus da LTI foi isolado em amostras de 22 granjas entre a primeira e a quinta passagem, sendo o isolamento confirmado quando a suspensão da membrana corioalantóide (MCA) resultou positiva na reação *nested*-PCR. A figura 6 mostra os resultados do *nested*-PCR dos macerados de MCA, das 51 amostras, após cada passagem.

Após o quinto dia de incubação, observou-se que 14 amostras produziram nos embriões diversos graus de congestão e hemorragia e placas de cor branca, tipo *pox* sobre a MCA. A figura 7 mostra as placas esbranquiçadas sobre a MCA. Verificaram-se estas alterações a partir da primeira passagens (2 amostras), segunda passagem (3 amostras), terceira passagem (4 amostras), quarta passagem (1 amostra) e quinta passagem (4 amostras). A figura 8 mostra o número de membranas corioalantóide com alterações, após cada passagem em ovo embrionado.

Figura 6 - Isolamento do VLTi em ovos embrionados de galinha SPF inoculado via membrana corioalantóide

Figura 7 - Isolamento do VLTi em ovos embrionados de galinha SPF depois da inoculação pela MCA. Notar as placas esbranquiçadas sobre a MCA

Figura 8 - Detecção de lesões em embriões SPF causados pela inoculação do VLTl, via membrana corioalantóide

5.4 DETECÇÃO DO VLTÍ POR PCR E ISOLAMENTO VIRAL

O VLTÍ foi isolado em 22 granjas, ou seja, em 43% dos casos estudados, enquanto a técnica *nested*-PCR padronizada detectou 23 granjas positivas ao VLTÍ (45%). Considerando os resultados das duas técnicas, determinou-se que 24 granjas foram positivas ao VLTÍ (47%). Estes resultados são ilustrados na figura 9.

A reação de *nested*-PCR padronizada, quando comparada com o isolamento viral em ovos embrionados procedentes de galinha SPF, demonstrou maior sensibilidade diagnóstica. Somente uma granja positiva no isolamento viral não foi positiva por *nested*-PCR, enquanto em duas granjas positivas no *nested*-PCR, não foi possível se fazer o isolamento do VLTÍ. A figura 10 apresenta estes resultados.

Desta forma, de acordo com os resultados da reação de *nested*-PCR padronizada neste experimento, e os resultados de isolamento viral, 24 granjas (n=51) foram positivas para o VLTÍ. A figura 11 mostra estes resultados.

A figura 12 apresenta a associação de sinais clínicos e mortalidade com a detecção do vírus da LTI. Em 46% dos casos, ou seja, das 24 granjas positivas, 11 apresentaram aumento de mortalidade e sinais clínicos suspeitos de LTI.

Em 87,5% (vinte e uma granjas) das 24 granjas positivas para LTI, existiam aves em produção de ovos no momento da coleta das amostras. A figura 13 apresenta estes resultados.

O quadro 7 mostra a identificação das amostras clínicas, idades dos lotes, histórico clínico e os resultados fornecidos pelas técnicas de *nested*-PCR e isolamento viral conduzidas em este estudo.

A sensibilidade e a especificidade da técnica de PCR desenvolvida neste trabalho, calculada em relação ao isolamento viral, foram de 95,45% e 93,1% respectivamente.

Figura 9 - Detecção do VLT por *nested*-PCR e isolamento viral em amostras de granjas de poedeiras comerciais procedentes de Bastos (SP)

Figura 10 - Detecção do VLTi por *nested*-PCR antes e depois do isolamento viral

Figura 11 - Detecção do VLTi em granjas de postura comercial da região de Bastos (SP)

Figura 12 - Histórico clínico das granjas positivas ao VLTÍ

Figura 13 - Etapa produtiva das aves nas granjas positivas ao VLTÍ

GRANJA	IDADE	SINAIS	MORTA- LIDADE	<i>Nested</i> PCR	ISOLA- MENTO	GRANJA	IDADE	SINAIS	MORTA- LIDADE	<i>Nested</i> PCR	ISOLA- MENTO
1	Produção	Não	Normal	+	+	14	Produção	Não	Normal	+	+
2	Produção	Não	Normal	-	-	15	Produção	SIM	Aumentada	+	+
3	Produção	Não	Normal	-	-	16	Produção	SIM	Aumentada	+	+
4	Produção	Não	Normal	-	-	17	Recria	Não	Normal	-	-
5	Produção	Não	Normal	-	-	18	Produção	SIM	Aumentada	+	+
6	Produção	Não	Normal	-	-	19	Produção	Não	Normal	-	-
7	Recria	Não	Normal	-	-	20	Recria	Não	Normal	+	+
8	Produção	Não	Normal	-	-	21	Produção	SIM	Normal	+	+
9	Recria	Não	Normal	-	-	22	Recria	SIM	NP	-	-
10	Recria	Não	Normal	-	-	23	Produção	SIM	Aumentada	+	+
11	Produção	Não	Normal	+	+	24	Recria	Não	Normal	-	-
12	Produção	SIM	Normal	-	-	25	Produção	Não	Normal	-	-
13	Produção	SIM	Aumentada	+	-	26	Produção	SIM	Aumentada	+	+

(+): Resultado positivo; (-): Resultado negativo, (NP): dados não proporcionados.

Quadro 7 - Amostras clínicas associadas à doença respiratória e aumento de mortalidade, procedentes da região de Bastos (SP) e recebidas durante 2003. Comparação entre métodos de detecção do VLTi (LABOR-FMV-USP)

GRANJA	IDADE	SINAIS	MORTA-LIDADE	<i>Nested</i> PCR	ISOLA-MENTO	GRANJA	IDADE	SINAIS	MORTA-LIDADE	<i>Nested</i> PCR	ISOLA-MENTO
27	Recria	SIM	NP	+	+	40	Produção	Não	Normal	+	+
28	Produção	Não	Normal	-	-	41	Produção	Não	Normal	+	+
29	Produção	Não	Normal	-	-	42	Produção	Não	Normal	-	-
30	Produção	SIM	Aumentada	+	+	43	Produção	Não	Normal	+	-
31	Produção	Não	Normal	+	+	44	Produção	Não	Normal	-	-
32	Produção	SIM	Aumentada	+	+	45	Produção	Não	Normal	-	-
33	Produção	Não	Normal	+	+	46	Produção	Não	Normal	+	+
34	Recria	Não	Normal	-	-	47	Produção	Não	Normal	-	-
35	Produção	Não	Normal	+	+	48	Produção	Não	Normal	-	-
36	Recria	Não	Normal	-	-	49	Recria	Não	Normal	-	-
37	Produção	Não	Normal	-	-	50	Produção	SIM	Aumentada	+	+
38	Produção	SIM	Normal	-	-	51	Recria	Não	Normal	-	+
39	Produção	Não	Normal	+	+						

(+): Resultado positivo; (-): Resultado negativo, (NP): não proporcionados.

Quadro 7 - (Cont.) Amostras clínicas associadas à doença respiratória e aumento de mortalidade, procedentes da região de Bastos (SP) e recebidas durante 2003. Comparação entre métodos de detecção do VLTi (LABOR-FMV-USP)

5.5 DETECÇÃO DE OUTROS AGENTES RESPIRATÓRIOS

O vírus da doença de Newcastle, o pneumovírus aviário, e o *Mycoplasma gallinarum* não foram detectados em nenhuma das 51 granjas analisadas. O vírus da bronquite infecciosa das galinhas (VBIG) foi detectado em uma granja e o *Mycoplasma synoviae* (MS) foi encontrado em oito granjas (Figura 14). Em todos os casos os controles positivos amplificaram o fragmento esperado, e os controles negativos não amplificaram nenhum produto.

O VBIG foi detectado em uma granja negativa para LTI, mas onde existia aumento de mortalidade e sinais clínicos respiratórios. Foram encontrados seis casos de co-infecção MS - VLTi, e um caso de co-infecção MS - VBIG. Somente em uma granja, que apresentava sinais respiratórios, o MS foi o único agente respiratório detectado. A figura 15 mostra estes resultados.

Figura 14 - Agentes respiratórios detectados em amostras de granjas de postura comercial com doença respiratória

Figura 15 - Doenças envolvidas no surto com sinais respiratórios em granjas de postura comercial

6 DISCUSSÃO

O vírus da laringotraqueíte infecciosa é um dos principais patógenos aviários, que dependendo do estado imune das aves afetadas pode produzir morbidade de até 100%, e uma mortalidade altamente variável que pode atingir até 70% (COVER, 1996; GUY; BAGUST, 2003; HAYASHI et al., 1985; SELLERS et al., 2004). A importância da doença é decorrente das perdas de produção tanto em frangos de corte como em poedeiras comerciais.

Apesar da laringotraqueíte infecciosa (LTI) ter sido uma das primeiras doenças controladas pelo uso de vacinas atenuadas, surtos da forma severa e branda da doença foram e estão sendo descritos até hoje em diferentes países, principalmente em áreas de criação intensiva. Desta forma, o diagnóstico torna-se imprescindível e fundamental para a adoção das medidas de controle da doença.

O diagnóstico rotineiro da LTI inclui o isolamento viral tanto em ovos embrionados como em cultura celular, e histopatologia. As deficiências destas técnicas como: falta de especificidade, procedimentos muito trabalhosos e demorados e muitas vezes com resultados falso negativos, levaram ao desenvolvimento de técnicas de detecção mais rápidas e específicas como a PCR.

A glicoproteína E é importante na expressão da virulência do vírus da Pseudorína (VPR) e do herpesvirus felino, estando envolvida na disseminação célula-célula e na liberação viral (BABIC, 1996; METTENLEITER, 1991). Sendo uma proteína essencial ao vírus, é esperado que exista alta identidade entre o gene que codifica esta proteína entre as várias cepas do VLTI e que fosse encontrado pouco polimorfismo. Adicionalmente, Humberd et al. (2002), demonstraram por análise de

seqüenciamento que o gene desta glicoproteína (gE) possuía regiões altamente conservadas. Assim, o direcionamento de um método de diagnóstico baseado na detecção deste gene é uma abordagem válida para a detecção do VLTl.

A padronização de uma reação de técnica de *nested*-PCR dirigida à amplificação de um segmento de 219 pares de base do gene codificador da glicoproteína E foi realizada no Laboratório de Ornitopatologia com o objetivo de se obter um método de diagnóstico rápido para examinar amostras de campo. O *nested*-PCR foi aplicado em todas as amostras de traquéia, pulmão e conjuntiva das 51 granjas de poedeiras comerciais e mostrou-se eficiente.

Os *primers* escolhidos para a amplificação eram complementares a uma região de genoma viral de alta identidade entre as cepas do VLTl, sendo, portanto, adequados para o desenvolvimento de método de detecção. Tanto os *primers* GE1S e GE2AS utilizados na reação de PCR, quanto os *primers* GE3S e GE4AS, usados na reação *nested*-PCR se mostraram eficientes na detecção do VLTl.

O principal objetivo ao desenhar *primers* para uma reação de PCR é alcançar uma ótima relação entre especificidade e eficiência de amplificação. *Primers* de baixa especificidade produzem fragmentos em dimensões inesperadas ou fragmentos extras aos esperados. A eficiência de amplificação refere-se à proximidade de uma amplificação exponencial das fitas moldes que pode alcançar uma reação de PCR (DIEFFENBACH; LOWE; DVEKSLER, 1995).

A especificidade de uma reação de PCR é influenciada principalmente pela temperatura de hibridização e pelas dimensões dos *primers* empregados durante os ciclos de amplificação. Quanto menor é a temperatura de hibridização, maior a possibilidade de hibridização inespecífica dos *primers* às fitas de DNA, e, com isto, a especificidade da técnica diminui (DIEFFENBACH; LOWE; DVEKSLER, 1995).

Neste experimento, foi utilizada a temperatura de hibridização sugerida pelo programa Oligo (© 1999-2003 Molecular Biology Insights, Inc.), ou seja, 58°C, para as reações de PCR e *nested*-PCR. A técnica de *nested*-PCR padronizada demonstrou alta especificidade analítica, pois não foi possível amplificar DNA celular das aves, de *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae* ou cDNA dos vírus de Newcastle, bronquite infecciosa e pneumovirose aviária (item 4.1.3).

Primers que possuem 18 a 24 nucleotídeos tendem a ser específicos se a temperatura de hibridização a ser adotada na reação for próxima à sua temperatura de *melting* (TM), que por definição é a temperatura em que 50% das fitas complementares da dupla fita dupla encontram-se dissociadas. *Primers* muito longos podem diminuir a eficiência de amplificação, pois a fração de fita molde hibridizada aos *primers* durante a etapa de hibridização é inversamente proporcional às suas dimensões. Por outro lado, a sensibilidade da reação é maior quando se utilizam *primers* complementares às regiões de codificação de proteínas não estruturais (DIEFFENBACH; LOWE; DVEKSLER, 1995).

Neste experimento foram escolhidos dois pares de *primers* de entre 20 e 23 nucleotídeos, que hibridizam uma região que codificam a glicoproteína E, uma proteína estrutural. Assim, esperava-se uma eficiente amplificação na reação padronizada, como foi experimentalmente demonstrada neste trabalho (Quadro 1).

A reação *nested*-PCR é um procedimento que consiste em uma segunda etapa de amplificação do ácido nucléico onde os DNA molde são os fragmentos amplificados em uma reação de PCR anterior. Esta nova amplificação produz fragmentos menores já que os *primers* utilizados nesta etapa são complementares as regiões internas do fragmento molde.

A dupla amplificação de PCR (*nested*-PCR) aumenta a sensibilidade analítica deste procedimento na detecção de baixas quantidades de vírus. O método de detecção escolhido (*nested*-PCR) baseou-se na propriedade deste método de aumentar a sensibilidade analítica obtida quando é usada somente uma única amplificação, e para a obtenção de um *amplicom* que poderia ser utilizado em análise complementar com outras técnicas como o seqüenciamento de DNA, por exemplo, para confirmação de identidade ou análise filogenética.

O limite de detecção de DNA na reação de *nested*-PCR padronizada foi entre 3 a 6 ng/ μ L de DNA. Estes valores estão acima daqueles obtidos por Alexander e Nagy (1997) e Humberd et al. (2002), não entanto foi melhor que os 62.5 ng/ μ L encontrados por Abbas, Andreasen e Jackwood (1996).

Para confirmar a especificidade da técnica de *nested*-PCR padronizada neste trabalho e para conseguir-se uma correta caracterização do VLTI, fez-se necessário o seqüenciamento do fragmento de 219 pares de base obtido. O seqüenciamento do DNA obtido por *nested*-PCR a partir de uma amostra de *pool* de traquéia e conjuntiva de uma granja que apresentou sinais clínicos suspeitos de LTI no momento da colheita das amostras produziu uma seqüência de 200 nucleotídeos do gene que codifica a glicoproteína E, a qual, quando comparada com seqüências disponíveis no Genbank através do BLASTn, resultaram apenas em seqüências derivadas do VLTI, sem outras seqüências de escore significativo.

A banda de 219 pares de base utilizada para o seqüenciamento foi produzida em uma reação de *nested*-PCR na qual não se evidenciaram bandas inespecíficas, nem bandas nos controles negativos e nos controles inseridos na fase de *nested* para se monitorar contaminações por DNA amplificado. Dessa forma, descarta-se a

possibilidade de contaminações entre a amostra controle positivo e as amostras de campo.

A sensibilidade do teste padronizado foi avaliada quando os resultados foram comparados com aqueles obtidos por o isolamento em ovos embrionados de galinha SPF, técnica considerada de referência e utilizada rotineiramente (ALEXANDER; KEY; NAGY 1998; IZUCHI; HASEGAWA, 1982; SELLERS et al., 2004). Neste estudo, a *nested*-PCR mostrou alta sensibilidade (Quadro 7).

Uma vez que o *nested*-PCR padronizado mostrou-se eficiente na detecção do VLTi na amostra isolada e utilizada como controle positivo, esta foi empregada em amostras de campo para se avaliar seu comportamento. As amostras procediam de 51 granjas de postura comercial da região de Bastos, Estado de São Paulo. O surto de doença respiratória que se iniciou nesta região no final do 2002 causou alta mortalidade em muitas granjas e queda na produção de ovos como consequência dos sinais e lesões no trato respiratório das aves afetadas. Os sinais clínicos e lesões necroscópicas observadas no campo, assim como a ausência do uso de vacinas contra a doença de laringotraqueíte, direcionaram o diagnóstico presuntivo para esta doença, a qual não tinha sido relatada previamente nesta região, nem em regiões vizinhas.

Quando o *pool* de amostras de traquéias, pulmões e conjuntivas de cada uma das 51 granjas foi submetido à reação de *nested*-PCR padronizada, 23 granjas foram detectadas como positivas (Figura 3). Destas 23 granjas, 12 não apresentavam doença respiratória clínica no momento da coleta das amostras (Figura 4). Normalmente, os sinais clínicos aparecem entre os dias 6 a 12 pós-infecção natural (COVER, 1996), mas as técnicas de PCR podem detectar DNA viral desde o terceiro dia PI (ALEXANDER; NAGY, 1997). Portanto, é possível que a

coleta das amostras nestas granjas possa ter acontecido nas fases iniciais da infecção, antes da aparição e manifestação dos sinais clínicos. Outra possível explicação é que o vírus envolvido no surto pudesse ter um grau moderado de patogenicidade e precisava de condições favoráveis para a manifestação clínica da doença, como por exemplo, infecções secundárias ou condições ambientais adversas, as quais poderiam ter ocorrido nas granjas que apresentaram sinais clínicos. No entanto, considerando a alta taxa de mortalidade e os sinais clínicos severos que foram observados nas outras granjas, que envolvia tanto aves de produção como aves de recria, sugere e evidencia que o vírus envolvido neste surto tinha alta virulência.

As infecções latentes se caracterizam pelo estabelecimento persistente do vírus da LTI em aves depois de uma infecção aguda (METTENLEITER, 1991; WILLIAMS et al., 1992b). No caso destas 12 granjas, nenhuma apresentou histórico de doença respiratória, portanto não existe possibilidade desta hipótese.

Para a detecção do VLTi foram testadas amostras de traquéia, pulmão e conjuntiva por se tratarem de órgãos-alvo envolvidos nos ciclos de replicação e infecção do vírus. A maioria de trabalhos publicados e dirigidos ao diagnóstico laboratorial e padronização de novas ferramentas de diagnóstico do VLTi incluem quase que exclusivamente amostras de traquéia, tanto na forma de macerado do órgão direto como suabe traqueal (ABBAS; ANDREASEN, 1996; GARCIA; RIBLET, 2001; HUMBERD et al., 2002; SELLERS et al., 2004; WILLIAMS; SAVAGE; JONES, 1994).

Em nosso estudo, de um total de 23 granjas diagnosticadas como positivas para LTI pela *nested*-PCR padronizada, o VLTi foi detectado em 18 granjas pela traquéia, em 5 granjas pelo pulmão e em 12 granjas pela conjuntiva (Figura 5).

O VLTI foi detectado em traquéia em 78% dos casos positivos e justifica sua eleição para o diagnóstico da doença. Por outro lado, foi detectado no pulmão em apenas 22% dos casos. Agora, nas amostras de macerado de conjuntiva, o VLTI foi detectado pelo *nested*-PCR em amostras de 11 granjas (52 % dos casos), sugerindo a importância da inclusão deste órgão no diagnóstico da LTI.

As amostras constituídas exclusivamente por traquéias não se mostraram suficientemente adequadas quando testadas por *nested*-PCR para o diagnóstico da totalidade dos casos positivos por esta técnica, uma vez que apenas 18 das 23 amostras encontradas positivas eram assim constituídas. Entretanto, observa-se que, associando os resultados obtidos com as amostras de traquéia e conjuntiva, verifica-se aumento na detecção de amostras positivas. Estes resultados demonstram a importância da inclusão de amostras de conjuntiva como órgão a ser coletado quando é requerido fazer o diagnóstico da laringotraqueíte tanto para casos suspeitos em surtos quanto para vigilância epidemiológica.

As amostras de conjuntiva foram eleitas para a detecção do VLTI baseado nos resultados de Alexander e Nagy (1997) e no sucesso demonstrado por Key et al. (1994) na detecção do vírus por hibridação de DNA a partir de suabes de conjuntiva. Estes autores demonstraram previamente que o VLTI pode ser detectado em suabes de conjuntiva com a mesma frequência que em suabes de traquéia. Isto sugere que pode existir uma alta quantidade de vírus na conjuntiva. Na faringe, a quantidade de vírus pode ser diluída pela produção de muco e muitas partículas virais podem passar ao trato digestivo por deglutição. Além disso, inibidores que podem estar presentes nas amostras de traquéia e faringe, podem não estar presentes na conjuntiva.

Das amostras de campo das 51 granjas submetidas à técnica de *nested*-PCR, 23 foram positivas e 28 negativas (Figura 3). Foi notável a concordância entre os resultados positivos fornecidos pelas técnicas de isolamento viral em ovos embrionados e a *nested*-PCR, ou seja, em todas as ocasiões em que o vírus foi isolado, o DNA do VLTi foi detectado através de *nested*-PCR, exceto em um caso (granja identificada com o número 51), onde o VLTi foi isolado na quinta passagem e o *nested*-PCR a partir de macerado de órgão direto foi negativo (Figura 9).

Uma explicação possível para esta ocorrência poderia ser a existência de partículas virais em baixa concentração presentes na amostra original submetida a *nested*-PCR. Este evento é comum nas fases iniciais e tardias da infecção. Demonstrou-se experimentalmente que o maior título viral era detectado entre os dias 2 e 4 pós-infecção (PI), diminuiu até o dia 6 a 10 PI, e depois, embora as lesões persistissem, não era detectável (BAGUST, 1986; BAGUST, CALNEK; WFAHEY, 1986).

Outra possibilidade é que em traquéias infectadas com o VLTi de alta virulência existe intensa inflamação com alta infiltração de heterófilos, e os fatores associados com a inflamação levam a destruição das células infectadas e com elas as partículas virais. Por outro lado, o exsudato inflamatório e o sangue presente na amostra podem conter inibidores da *Taq polimerase*, por exemplo, porfirina (ABBAS; ANDREASEN, 1996). No entanto, as amostras da granja número 51 procediam de aves de recria que não apresentaram sinais clínicos respiratórios, nem aumento da mortalidade, nem lesões à necropsia, e, portanto, esta explicação não é a mais provável.

Outra possível explicação para a falha de amplificação é a elevada concentração de DNA na amostra original. Como descreveram Guatelli et al.¹ (1989 apud ALEXANDER; KEY; NAGY, 1998, p. 70), excessivas quantidades de DNA diminui a eficiência da reação de PCR. Assim, em nosso estudo, na reação de PCR padronizada, a amplificação de DNA neste caso pode ter sido inibida devido às elevadas quantidades de DNA *template* que poderiam inibir a reação de amplificação.

Ainda, é necessário considerar que outras falhas na reação de PCR poderiam ter ocorrido: perda de material nas etapas de extração de DNA, mudanças sucessivas na temperatura devido a congelamento e descongelamento de amostras, levando à degradação da partícula viral e seu DNA.

A sensibilidade achada pela técnica de *nested*-PCR padronizada neste trabalho em relação ao isolamento viral foi 95,45%, valor que valida a aplicação desta técnica como ferramenta de diagnóstico para a detecção do VLTl em amostras de campo.

A especificidade da técnica de PCR desenvolvida neste trabalho, calculada em relação ao isolamento viral, foi de 93,1%. Esta alta especificidade do *nested*-PCR é próxima ao esperado e concorda com a literatura disponível (ALEXANDER; NAGY, 1997; HUMBERD et al., 2002; WILLIAMS; SAVAGE; JONES, 1994).

As granjas identificadas como os números 13 e 43 (Quadro 7), foram positivas na reação de *nested*-PCR, mas foram negativas no isolamento viral depois da quinta passagem em ovos embrionados. Várias causas possíveis podem explicar este achado.

¹ GUATELLI, J.; GINGERAS, T.; RICHMAN, D. Nucleic acid amplification in vitro: detection of sequences with low copy numbers and application to diagnosis of HIV type 1 infection. **Clinical Microbiological Review**, v. 2, n. 2, p. 217-226, 1989.

O isolamento viral requer partículas virais infectantes, enquanto que a PCR requer somente DNA, portanto, em teoria, a PCR deveria ser mais sensível que o isolamento (ABBAS; ANDREASEN, 1996).

Condições adversas, principalmente a temperatura nas etapas de coleta, transporte e conservação das amostras até o momento de seu processamento podem ter ocasionado degeneração nos tecidos e partículas virais, afetando a infectividade viral.

Outra explicação possível para a falha no isolamento viral seria o baixo título viral presente na amostra original e a necessidade de mais passagens para o isolamento viral. Baixo título viral pode ser encontrado nas fases tardias da infecção ou em infecções persistentes (aves portadoras assintomáticas).

Em um estudo comparando a PCR com isolamento viral, observou-se que no início da infecção a PCR não era tão eficiente como o isolamento viral na identificação de aves infectadas. Entretanto, nas etapas posteriores da infecção, a PCR era mais sensível que o isolamento viral. Este fenômeno pode ser explicado pelo efeito dos anticorpos neutralizantes nesta fase da infecção (ALEXANDER; NAGY, 1997).

Em alguns casos, o fracasso no isolamento do VLTi pode indicar a presença de baixos níveis virais, devido à presença de aves portadoras (ABBAS; ANDREASEN, 1996; WILLIAMS; SAVAGE; JONES, 1994). O VLTi latente foi detectado em gânglios trigêmeos de aves recuperadas da doença, 61 dias após a infecção, através de PCR, mas o isolamento do vírus não foi conseguido (WILLIAMS et al., 1992b). Assim, a PCR é uma ferramenta de importante valor na detecção de infecções agudas e latentes do VLTi (ABBAS; ANDREASEN; JACKWOOD, 1996). Apesar do fato de que, no presente estudo, amostras de gânglios trigêmeos (sítio

principal de latência viral) não tenham sido incluídas, também na traquéia o vírus já foi encontrado em estágio de latência (BAGUST; CALNEK; WFAHEY, 1996; HUGHES et al., 1987; WILLIAMS et al., 1992b) e, uma vez que este órgão apresentou-se positivo por PCR em amostras negativas por isolamento, é possível que a PCR aqui padronizada tenha detectado casos de latência em traquéia.

Assim sendo, na granja identificada com o número 13, cuja amostra foi positiva por PCR e negativa por isolamento, como as aves apresentavam sinais clínicos e lesões suspeitas de LTI, a hipótese mais provável que no momento da coleta das amostras, as aves estivessem na etapa tardia da infecção, e, portanto, os baixos títulos virais nesta fase poderiam explicar a falta de isolamento viral.

Na granja 43 (Quadro 7), as aves não apresentavam histórico clínico da doença. Assim, o baixo título viral ou ausência de partículas virais viáveis nestas amostras desta granja poderiam explicar o resultado negativo no isolamento viral, em função de a doença estar em fase inicial ou por se tratar de um caso de latência. As amostras desta e das outras granjas foram passadas cinco vezes por ovos embrionados. Talvez, um maior número de passagens seria necessário para esclarecer este resultado.

O vírus foi isolado em ovos embrionados entre a primeira e a quinta passagem (Figura 6). Em 36 % dos casos onde houve isolamento viral, não foi possível observar lesões nos embriões, nem placas na membrana corioalantóide (MCA) (Figura 8). Sellers et al. (2004) não conseguiram observar lesões em ovos embrionados depois de três passagens de uma cepa que causou doença branda da LTI em frangos de corte nos EUA, tendo utilizado testes imunohistoquímicos para confirmar o isolamento. No presente experimento, foi usada a metodologia convencional para o isolamento do VLTi em ovos embrionados (IZUCHI;

HASEGAWA, 1982; LINARES et al., 1994), todas as amostras foram passadas até cinco vezes em ovos embrionados e utilizou-se a reação *nested*-PCR padronizada para confirmar o isolamento. O baixo título de partículas viáveis no inóculo poderia explicar a ausência de lesões visíveis e passagens adicionais poderiam ser necessárias. No entanto, estas passagens adicionais necessitariam de um tempo maior, tornando-a uma técnica de pouco valor em surtos de campo que precisam de um diagnóstico rápido.

Nas técnicas desenvolvidas para o diagnóstico da LTI, incluindo a PCR e o isolamento viral, podem ocorrer falhas na detecção de pequenas quantidades de vírus disseminadas por aves vacinadas ou infectadas com vírus de campo (WILLIAMS; SAVAGE; JONES, 1994). Portanto, é prudente o uso de uma combinação de testes de laboratório acompanhados pelo histórico clínico para alcançar um resultado rápido e definitivo.

Neste estudo, para o diagnóstico da LTI em granjas da região de Bastos foi escolhido o isolamento viral em ovos embrionados como teste de referência e foi padronizada uma reação de PCR que confere resultados rápidos, específicos e de aceitável sensibilidade. As amostras primeiramente foram testadas com a *nested*-PCR e depois foram passadas em ovos embrionados no intuito de aumentar o título viral, o qual possa ser detectável pela *nested*-PCR. Esta metodologia foi utilizada por Alexander, Key e Nagy (1998), que analisaram 37 amostras inicialmente negativas a PCR, isolaram o VLTI em ovos embrionados e encontraram 22, 10 e 2 amostras positivas ao PCR depois da primeira, segunda e terceira passagens respectivamente. A partir de 10 amostras negativas pela PCR, estes autores também conseguiram isolar e detectar o VLTI por PCR depois da primeira e terceira passagem em células de fígado de embrião de galinha em 4 e 6 amostras,

respectivamente. No presente trabalho, somente uma granja apresentou resultado negativo na *nested*-PCR inicial, sendo necessário o isolamento viral para a confirmação da presença do vírus. Comparando estes resultados como os obtidos por Alexander, Key e Nagy (1998), podemos inferir que a *nested*-PCR padronizada no presente trabalho foi mais sensível.

Esta metodologia apresenta maiores vantagens quando é comparada com outras técnicas de diagnóstico. No exame histopatológico, os sincícios e corpúsculos de inclusão somente podem ser observados pelo um limitado tempo durante a infecção aguda, ou seja, nos cinco primeiros dias da infecção (ABBAS; ANDREASEN; JACKWOOD, 1996; HUMBERD et al., 2002; TIMURKAAN et al., 2003), enquanto o vírus latente já foi detectado após 61 dias da infecção em gânglio trigêmeo usando a PCR (WILLIAMS et al., 1992b).

Williams, Savage e Jones (1994) determinaram que a PCR era mais sensível que o isolamento em cultura de fígado de embrião de galinha e microscopia eletrônica. O isolamento em células pode precisar de até sete passagens para se observar o efeito citopático e, além disso, amostras com alta concentração de material tóxico e com contaminação bacteriana podem dificultar o isolamento (WILLIAMS; SAVAGE; JONES, 1994). Ainda, o isolamento pode demorar até quatro semanas e pode precisar de outras técnicas para que os resultados sejam confirmados. Em comparação, a PCR é uma técnica menos trabalhosa que oferece resultados mais rápidos, os mesmos que são necessários para que medidas de controle da doença sejam tomadas.

Embora a microscopia eletrônica possa detectar partículas de herpesvírus com uma concentração mínima de $4,5 \log_{10}/\text{mL}$ (HUGHES; JONES, 1988), através desta

não foi possível conhecer a espécie do herpesvírus nem se as partículas virais eram viáveis (WILLIAMS; SAVAGE; JONES, 1994).

A associação das técnicas de PCR com o isolamento em ovos embrionados permite que as desvantagens de cada um dos testes, quando utilizados em separado, sejam superadas. Assim, em um primeiro momento, as amostras podem ser testadas com uma PCR sensível, e quando se tenha a suspeita de algum caso falso negativo, a amostra pode ser passada por ovos embrionados no intuito de aumentar o título viral.

Os resultados apresentados neste trabalho demonstraram que a *nested*-PCR é um método sensível e altamente específico para a detecção de DNA tanto em amostras isoladas, como em amostras de campo, constituindo-se numa ferramenta para a detecção de baixas quantidades de DNA viral. Uma contribuição desta metodologia é a detecção do VLTi em estágios iniciais em um surto, o que permitiria que medidas de biosegurança apropriadas fossem tomadas para controlar a disseminação da doença.

O maior título viral pode ser detectado em aves infectadas experimentalmente entre os dias 2 a 4 pós-infecção, diminuindo até o sexto dia e não sendo mais detectável (ALEXANDER; NAGY, 1997; GUY; BAGUST, 2003). Em um surto, onde a infecção se dissemina com diferentes velocidades dentro de uma granja, um adequado número de amostras deve ser obtido aleatoriamente para se ter um resultado seguro, especialmente se é obtida somente uma amostragem. Para um diagnóstico mais seguro, aves em diferentes estágios da infecção, ou seja, aves assintomáticas e com manifestações clínicas deveriam ser selecionadas, sendo em alguns casos recomendável a coleta de amostras em mais de uma oportunidade.

Considerando os resultados da *nested*-PCR e os de isolamento em ovos embrionados, 24 granjas foram positivas de um total de 51 granjas testadas (Figura 9). Destas 24 granjas, 11 (46 % dos casos) apresentavam doença respiratória no momento da coleta das amostras, enquanto que das 14 granjas que apresentavam sinais respiratórios e/ou aumento da mortalidade, 11 (79% das granjas) foram positivas para LTI. Esta alta concordância entre sinais clínicos suspeitos de laringotraqueíte e detecção do agente etiológico desta doença, sugere que este agente poderia ser o causador das manifestações clínicas observadas.

No presente estudo, o agente etiológico da LTI foi detectado e isolado principalmente em granjas com galinhas em etapa produtiva (87.5% dos casos) (Figura 14), enquanto que em somente três das 12 granjas com aves jovens incluídas neste estudo foram positivas a LTI. Considerando somente as granjas que apresentaram doença respiratória, 93% dos casos eram de aves adultas. Enquanto, das três granjas com aves de recria que foram positivas a LTI, somente uma apresentava sinais respiratórios no momento da amostragem. Estes resultados corroboram com os da literatura, com relação a maior prevalência do VLTI em aves adultas ou em etapa produtiva, assim como com os dados de que principalmente neste tipo de aves ocorre sintomatologia suspeita da LT. Cover (1996), assinala que todas as aves são susceptíveis para a infecção, mas a doença clínica é mais freqüentemente observada em aves adultas o em estado de produção. Esta maior susceptibilidade das aves adultas poderia ser devido as maiores exigências fisiológicas nestas aves em produção de ovos, comprometendo o sistema imune e com isto a resposta aos patógenos.

No surto na região de Bastos, foram observadas sinais clínicos (como expectoração de secreção traqueal sanguinolenta) e lesões (como tampão caseoso

e hemorragia no lume traqueal) patognomônicas da LTI. Além disso, os resultados obtidos neste estudo pela *nested*-PCR padronizada e confirmados pelo isolamento viral mostraram uma alta presença do agente etiológico da LTI, principalmente nas granjas que apresentaram sinais respiratórias, aumento da mortalidade e queda na produção de ovos. Estes achados sugerem que o VLTi seria o responsável do surto.

Mesmo assim, como os sinais observados poderiam ser produzidos por outros patógenos, foi realizado um diagnóstico diferencial como os agentes das doenças de Newcastle (VNC), bronquite infecciosa das galinhas (VBIG), pneumovirose aviária (VPA) e Micoplasmose por MG e MS.

O VLTi foi o patógeno mais frequentemente detectado tanto nas amostras das 51 granjas como nas granjas com sintomatologia respiratória. Enquanto o VBIG foi detectado somente em uma granja e o *Mycoplasma synoviae* em 8 granjas. Os outros agentes não foram detectados em nenhuma granja (Figura 16).

O VLTi foi detectado e isolado em todas as granjas que apresentaram sintomatologia clínica, exceto em 3 casos (granjas identificadas com os números 12, 22 e 38). Na granja 22 foram detectados o vírus da bronquite infecciosa (VBIG) e *Mycoplasma synoviae* (MS) (Figura 15). O VBIG é agente primário de uma das principais doenças que afetam as aves e frequentemente, sozinho ou em associação com outros agentes produz doença clínica (CAVANAGH; NAQI, 2003). Nesta granja o quadro clínico pode ter sido complicado pelo MS.

É documentada a existência de cepas do *Mycoplasma synoviae* que podem causar infecções clínicas ou assintomáticas (KLEVEN, 2003). No presente estudo, MS foi detectado em 8 granjas que apresentaram doença clínica, mas em 6 destas também foi detectado o VLTi (Figura 15). Dessa forma, considerando a alta concordância entre doença clínica e a detecção do VLTi, o MS provavelmente atuou

como agente secundário. No entanto, na granja 38, o MS foi o único agente etiológico encontrado, sugerindo que esta cepa de MS poderia ser de alta patogenicidade.

Na granja 12 não foi encontrado nenhum dos agentes pesquisados neste trabalho. Outros patógenos aviários poderiam ter sido os causadores da doença respiratória observada nesta granja. O vírus da influenza aviária foi descartado por testes laboratoriais pelas autoridades sanitárias do Serviço Oficial Local do Estado de São Paulo (dados não publicados). *Avibacterium paragallinarum*, *Pasteurella multocida* e *Ornithobacterium rhinotracheale* não foram considerados no diagnóstico diferencial deste estudo, pois as doenças causadas por estes patógenos não têm características de epidemia como a observada no surto da região de Bastos (SP). Mesmo assim, podem ser os responsáveis pelos problemas respiratórios na granja 12. As práticas inadequadas de manejo, principalmente altas concentrações de amônia, também podem ter causado estes distúrbios.

Os resultados obtidos no presente estudo revelaram uma alta ocorrência do vírus da laringotraqueíte infecciosa (47% das granjas testadas), com uma alta concordância entre quadro clínico e detecção deste agente, que foi diagnosticado por isolamento viral e por uma técnica de *nested*-PCR padronizada, sendo que esta demonstrou ser uma ferramenta rápida, sensível e altamente específica para o diagnóstico da LTI.

De acordo com os resultados laboratoriais, somados ao histórico clínico e aos resultados do diagnóstico diferencial, podemos afirmar que o vírus da LTI detectado neste estudo foi o responsável pelo surto de uma doença respiratória iniciado no final do 2002 em granjas de poedeiras comercial na região de Bastos (SP).

7 CONCLUSÕES

- Os *primers* desenhados neste trabalho permitiram a amplificação de um fragmento específico do gene codificador da glicoproteína E (gE) do VLTl.
- A reação de *nested*-PCR padronizada neste trabalho mostrou-se altamente sensível e específica para a detecção do VLTl a partir de amostras isoladas e de campo, tomando como técnica de referência o isolamento viral.
- Através do seqüenciamento de DNA a partir do segmento amplificado pela *nested*-PCR padronizada neste estudo, foi possível confirmar a identidade do fragmento amplificado como sendo do gene codificador da gE do VLTl.
- Foram observadas lesões específicas em MCA do VLTl detectado nas amostras clínicas depois de seu isolamento em ovos embrionados de galinha SPF.
- Foi detectada uma alta freqüência de ocorrência do VLTl em amostras provenientes de granjas de poedeiras comerciais procedentes de uma região que apresentou um surto com sinais clínicos suspeitos da LTI.
- A freqüência do VLTl foi maior do que o VBIg e MS nas amostras clínicas analisadas e não foram detectados os agentes etiológicos das doenças de Newcastle, pneumovirose aviária e nem MG.

- O VLTÍ foi o agente causador do surto caracterizado por doença respiratória, queda na produção de ovos e aumento de mortalidade na região de Bastos (SP).

REFERÊNCIAS

ABBAS, F.; ANDREASEN, J. R. Comparison of diagnostic test for Infectious Laryngotracheitis. **Avian Diseases**, v. 40, n. 2, p. 290-295, 1996.

ABBAS, F.; ANDREASEN, J. R.; JACKWOOD, M. W. Development of a Polymerase chain reaction and a nonradioactive DNA probe for Infectious Laryngotracheitis Virus. **Avian Diseases**, v. 40, n. 1, p. 56-62, 1996.

ALDOUS E. W.; ALEXANDER, D. J. Technical review: detection and differentiation of Newcastle disease virus (avian paramyxovirus type I). **Avian Pathology**, v. 30, n. 2, p.117-129, 2001.

ALEXANDER, D. J. Newcastle disease and other Paramyxoviridae infectious. In: SAIF, Y. M.; BARNES, H. J.; GLISSON, J. R.; FADLY, A. M.; MCDOUGALD L. R.; SWAYNE, D. E. **Diseases of poultry**. 11. ed. Ames, IA: Iowa State University Press, 2003. p. 64-87.

ALEXANDER, H. S.; KEY, D. W.; NAGY, E. Analysis of Infectious Laryngotracheitis Virus isolates from Ontario and New Brunswick by the Polimerase chain reaction. **Canadian Journal Veterinary Research**, v. 62, n. 1, p. 68-71, 1998.

ALEXANDER, H. S.; NAGY, E. Polymerase chain reaction to detect Infectious Laryngotracheitis Virus in conjuntival swabs from experimentally infected chickens. **Avian Diseases**, v. 41, n. 3, p. 646-653, 1997.

ANDREASEN, J. R.; GLISSON, J. R.; GOODWIN, M. A.; RESURRECCION, R. S.; VILLEGAS, P.; Brown, J. Studies of Infectious Laryngotracheitis vaccines: Immunity in layers. **Avian Diseases**, v. 33, n. 3, p. 524-530, 1989.

ANDREASEN, J. R.; GLISSON, J. R.; VILLEGAS, P. Differentiation of vaccine strains and Georgia Field Isolates of infectious Laryngotracheitis Virus by their Restriction endonuclease fragment patterns. **Avian Diseases**, v. 34, n. 3, p. 646-656, 1990.

BABIC, N.; KLUPP, B.; BRACK, A.; METTENLEITER, T. C.; UGOLINI, G.; FLAMAND, A. Deletion of glycoprotein gE reduces the propagation of Pseudorabies virus in the nervous system of mice after intranasal inoculation. **Virology**, v. 219, n. 1, p. 279-284, 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. 581-595, 1986.

BAGUST, T. J.; CALNEK, B.; WFAHEY, K. J. Gallid-1 Herpesvirus Infection in the chicken. 3. Reinvestigation of the pathogenesis of Infectious Laryngotracheitis in acute and early post-acute respiratory diseases. **Avian Diseases**, v. 30, n. 1, 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. 2, p. 373-391, 1995.

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, n. 1, p. 65-72, 1999.

BAUTISTA, D. Isolation of Infectious laryngotracheitis virus (ILT virus) from peafowls and chickens with a history of respiratory diseases. In: AVMA ANNUAL CONVENTION, 140., 2003, Colorado. **Convention notes...** Colorado: American Association of Avian Pathologists, 2003. p. 24.

BELTRÃO, N.; FURIAN, T. Q.; FONSECA, G.; MACAGNAN, M.; FALLAVENA, L. C.; CANAL, C. Laryngotracheitis: reproducibility of the disease and comparison of diagnostic methods. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, n. 2, p. 72-73, 2003.

BELTRÃO, N.; FURIAN, T. Q.; LEÃO, J. A.; PEREIRA, R. A.; BRUNELLI, L.; CANAL, C. Detecção do vírus da laringotraqueíte infecciosa das galinhas no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 24, n. 2, p. 85-88, 2004.

BRAUNDT, C. R.; GRAU, D. R. Mixed infection with herpes simplex virus type 1 generates recombinants with increased ocular and neurovirulence. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 31, n. 5, p. 2214-2223, 1990.

CALLISON, S. A.; JACKWOOD, M. W.; HILT, D. A. Molecular characterization of infectious bronchitis virus isolates foreign to the United States and comparison with United States isolates. **Avian Diseases**, v. 45, n. 2, p. 492-499, 2001.

CAVANAGH, D.; MAWDITT, K.; BRITTON, P.; NAYLOR, C. J. Longitudinal field studies of infectious bronchitis virus and avian pneumovirus in broilers using type-specific polymerase chain reactions. **Avian Pathology**, v. 28, n. 3, p. 593-605. 1999.

CAVANAGH, D.; MAWDITT, K.; WELCHMAN, D.; BRITTON, P.; GOUGH, R. E. Coronaviruses from pheasants (*Phasianus colchicus*) are genetically closely related to coronaviruses of domestic fowl (infectious bronchitis virus) and turkeys. **Avian pathology**, v. 31, n. 1, p. 81-93. 2002.

CAVANAGH, D.; NAQI, S. A. Infectious bronchitis. In: SAIF, Y. M.; BARNES, H. J.; GLISSON, J. R.; FADLY, A. M.; MCDOUGALD L. R.; SWAYNE, D. E. **Diseases of poultry**. 11. ed. Ames, IA: Iowa State University Press, 2003. p. 101-120.

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 Virological Methods**, v. 66, n. 2, p. 179-186, 1997.

CHARY, P.; RAUTENSCHLEITER, S.; NJENGA, M. K.; SHARMA, J. M. Pathogenic and immunosuppressive effects of Avian pneumovirus in turkey. **Avian Diseases**, v. 46, n. 1, p. 153-161, 2002.

CHOMKCYNSKI P. A. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and protein from the cell and tissues samples. **Biotechniques**, v. 15, n. 3, p. 532-537, 1993.

CLAVIJO, A.; NAGY, É. Differentiation of infectious Laryngotracheitis Virus strains by Polymerase chain reaction. **Avian Diseases**, v. 41, n. 1, p. 241-246, 1997.

COVER, M. S. The early history of Infectious Laryngotracheitis. **Avian Diseases**, v. 40, n. 3, p. 494-500, 1996.

DIEFFENBACH, C. W.; LOWE, T. M.; DVEKSLER, G. S. General concepts for PCR primer design. In: DIEFFENBACH, C. W.; DVEKSLER, G. S. **PCR primer, a Laboratory Manual**. London: CSHL Press, 1995. p. 133-141.

FAHEY, K. J.; YORK, J. J. The role of mucosal antibody in immunity to infectious laryngotracheitis virus in chickens. **Journal General Virology**, v. 71, n. 10, p. 2401-2405, 1990.

FERRARI, M.; METTENLEITER, T. C.; ROMANELLI, M. G.; CABASSI, E.; CORRADI, A.; DALMAS, N.; SILINI, R. A comparative study of Pseudorabies virus (PRV) strains with defects in thymidine kinase and glycoprotein genes. **Journal Comparative Pathology**, v. 123, n. 2-3, p. 152-163, 2000.

FUCHS, W.; ZIEMANN, K.; TEIFKE, J. P.; WERNER, O.; METTENLEITER, T. The non-essential UL50 gene of avian infectious laryngotracheitis virus encodes a functional dUTPase which is not a virulence factor. **Journal of General Virology**, v. 81, n. 3, p. 627-638, 2000.

FUJITA, K.; MAEDA, K.; YOKOYAMA, N.; MIYAZAWA, T.; KAI, C.; MIKAMI, T. In vitro recombination of feline herpesvirus type 1. **Archives of Virology**, v. 143, n. 1, p. 25-34, 1998.

GARCIA, M.; JACKWOOD, M. W.; LEVISOHN S.; KLEVEN, S. H. Detection of *Mycoplasma gallisepticum*, *M. synoviae* and *M. iowae* by multi-species polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism. **Avian Diseases**, v. 39, n. 3, p. 606-616, 1995.

GARCIA, 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.

GLAZENBURG, K. L.; MOORMANN, R. J. M.; KIMMAN, T. G.; GIELKENS, A. L. J.; PEETERS, B. P. H. Genetic recombination of pseudorabies virus: evidence that homologous recombination between insert sequence is less frequent than between autologous sequence. **Archives of Virology**, v. 140, n. 4, p. 671-685, 1995.

GODWIN, M. A.; SMELTZER, M. A.; BROWN, J.; RESURRECCION, R. S.; DICKSON, T. G. Comparison of histopathology to the direct immunofluorescent antibody test for the diagnosis of infectious laryngotracheitis in chickens. **Avian Diseases**, v. 35, n. 2, p. 389-391, 1991.

GOHM, D. S.; THUR, B.; HOFMANN, M. A. Detection of Newcastle diseases virus in organs and faeces of experimentally infected chickens using RT-PCR. **Avian Pathology**, v. 29, n. 2, p. 143-152, 2000.

GOUGH, R. E. Isolation of an avian pneumovirus from broiler chickens. **Veterinary Record**, v. 134, n. 14, p. 353-354, 1994.

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.

GRIFFIN, A. M. Identification of 21 genes of infectious laryngotracheitis virus using random sequencing of genomic DNA. **Journal General Virology**, v. 70, n. 11, p. 3085-3089, 1989.

GUO, P.; SCHOLZ, E.; TUREK, J.; NORDGREEN, R.; MALONEY, B. Assembly pathway of avian infectious laryngotracheitis virus. **American Journal Veterinary Research**, v. 54, n. 12, p. 2031-2039, 1993.

GUY, J. S.; BAGUST, T. J. Laryngotracheitis. In: SAIF, Y. M.; BARNES, H. J.; GLISSON, J. R.; FADLY, A. M.; MCDUGALD L. R.; SWAYNE, D. E. **Diseases of poultry**. 11. ed. Ames, IA: Iowa State University Press, 2003. p. 121-134.

GUY, J. S.; BARNES, H. J.; MORGAN, L. Virulence of Infectious Laryngotracheitis Viruses: Comparison of modified-live vaccine viruses and North Carolina field isolates. **Avian Diseases**, v. 34, n. 1, p. 106-113, 1990.

GUY, J. S.; BARNES, H. J.; MUNGER, 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, n. 2, p. 316-323, 1989.

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, n. 2, 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, n. 1, p. 77-86, 1992.

HAN, M. G.; KIM, S. J. Analysis of Korean strains on Infectious Laryngotracheitis Virus by nucleotide sequences and restriction fragment length polymorphism. **Veterinary Microbiology**, v. 83, n. 4, p. 321-331, 2001a.

HAN, M. G.; KIM, S. J. Comparison of virulence and restriction endonuclease cleavage patterns of infectious Laryngotracheitis viruses isolated in Korea. **Avian Pathology**, v. 30, n. 2, p. 337-344, 2001b.

HAN, M. G.; KIM, S. J. Efficacy of live virus vaccines against Infectious Laryngotracheitis assessed by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. **Avian Diseases**, v. 47, n. 2, p. 261-271, 2003.

HAYASHI, S.; ODAGIRI, Y.; KOTANI, T.; HORIUCHI, T. Pathological changes of tracheal mucosa in chickens infected with infectious laryngotracheitis virus. **Avian Diseases**, v. 29, n. 4, p. 943-950, 1985.

HIDALGO, H. Infectious Laryngotracheitis: a review. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 5, n. 3, p. 157-168, 2003.

HUGHES, C. S.; GASKELL, R. M.; JONES, R. C.; BRADBURY, J. M.; JORDAN, F. T. W. Effects of certain stress factors on the re-excretion of infectious laryngotracheitis virus from latently infected carrier birds. **Research in Veterinary Science**, v. 46, n. 3, 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. 3, p. 295-303, 1988.

HUGHES, C. S.; JONES, R. C.; GASKELL, R. M.; JORDAN, F. T. W.; BRADBURY, J. M. Demonstration in live chickens of the carrier state in infectious laryngotracheitis. **Research in Veterinary Science**, v. 42, n. 3, p. 407-410, 1987.

HUGHES, C. S.; WILLIAMS, R. A.; GASKELL, R. M.; JORDAN, F. T.; BRANDBURY, J. M.; BENNETT, M.; JONES, R. C. Latency and reactivation of infectious laryngotracheitis vaccine virus. **Archives of Virology**, v. 121, n. 2, p. 213-218, 1991.

HUMBERD, J.; GARCÍA, M.; RIBLER, S. M.; RESURRECCIÓN, 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.

IZUCHI, T.; HASEGAWA, A. Pathogenicity of Infectious Laryngotracheitis Virus as measured by chicken embryo inoculation. **Avian Diseases**, v. 26, n. 1, p. 18-25, 1982.

JAVIER, R. T.; SEDARANI, F.; STEVENS, J. G. Two virulent herpes simplex viruses generate lethal recombinants in vivo. **Science**, v. 234, p. n. 4777, 746-749, 1986.

JING, L. J.; COOK, K. A.; BROWN, T. D.; CAVANAGH, D. Detection of turkey rhinotracheitis virus in turkey using the polimerase chain reaction. **Avian Pathology**, v. 22, n. 4, p. 771-783, 1993.

JIRJIS, F.; NOLL, S.; HALVORSON, D.; NAGARAJA, K.; TOWNSEND, E.; SHEIK, A.; SHAW, D. P. Avian pneumovirus infectious in Minnesota turkey: experimental reproduction of the diseases. **Avian Diseases**, v. 44, n. 1, p. 222-226, 2000.

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, n. 3-4, p. 181-198, 1991.

JOHNSON, M. A.; TYACK, S. G. Molecular evolution of infectious laryngotracheitis virus (ILTV: gallid herpesvirus 1): an ancient example of *Alphaherpesviridae*. **Veterinary Microbiology**, v. 46, n. 1-3, p. 221-231, 1995.

KAPCZYNSKI, D. R.; TUMPEY, T. M. Development of a virosome vaccine for Newcastle Disease Virus. **Avian Diseases**, v. 47, n. 3, p. 578-587, 2003.

KEELER, C. L. *In vivo* characterization of A glycoprotein C mutant of Infectious laryngotracheitis virus. In: AVMA ANNUAL CONVENTION, 140., 2003, Colorado. **Convention notes...** Colorado: Americam Association of Avian Pathologists, 2003. p. 18.

KEELER, C. L.; HAZEL, J. W.; HASTING, J. E.; ROSENBERGER, J. K. Restriction endonuclease analysis of Delmarva field isolates of Infectious Laryngotracheitis Virus. **Avian Diseases**, v. 37, n. 2, p. 418-426, 1993.

KELLER, C. L.; BENSON, C. E.; DAVISON, S.; ECKROADE, R. J. Differences among restriction endonuclease DNA finger of Pennsylvania field isolates, vaccines strains and challenge strains of Infectious Laryngotracheitis Virus. **Avian Diseases**, v. 36, n. 3, p. 575-581, 1992.

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, n. 3, p. 467-474, 1994.

KINTNER, R. L.; ALLAN, R. W.; BRANDT, C. R. Recombinants are isolated at high frequency following in vivo mixed ocular infection with two avirulent herpes simplex virus type 1 strains. **Archives of Virology**, v. 140, n. 2, p. 231-244, 1995.

KLEVEN, S. H. Mycoplasmas in the etiology of multifactorial respiratory disease. **Poultry Science**, v. 77, n. 8, p. 1146-1149, 1998.

KLEVEN, S. H. Mycoplasma synoviae infection. In: SAIF, Y. M.; BARNES, H. J.; GLISSON, J. R.; FADLY, A. M.; MCDUGALD, L. R.; SWAYNE, D. E. **Diseases of poultry**. 11. ed. Ames, IA: Iowa State University Press, 2003. p. 756-765.

KOTIW, M.; WILKS, C. R.; MAY, J. T. Differentiation of infectious laryngotracheitis virus strains using restriction endonucleases. **Avian Diseases**, v. 26, n. 4, p. 718-731, 1982.

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, n. 1, p. 71-80, 1995.

KOTTIER, S. A.; CAVANAGH, D.; BRITTON, P. Experimental evidence of recombination in coronavirus infectious bronchitis virus. **Virology**, v. 213, n. 2, p. 569-580, 1995.

KRUGER, J. M.; SUSSMAN, M. D.; MAES, R. K. Glycoproteins gL and gE of Feline herpesvirus-1 are virulence genes: safety and efficacy of a gL-gE deletion mutant in the natural host. **Virology**, v. 220, n. 2, p. 299-308, 1996.

KWON, H. M.; JACKWOOD, M. W.; BROWN, T. P.; HILT, D. A. Polymerase chain reaction and a biotin-labeled DNA probe for detection of Infectious bronchitis virus in chicken. **Avian Diseases**, v. 37, n. 1, p. 149-156, 1993.

LAUERMAN, L. H. *Mycoplasma* PCR assay. In: _____. **Nucleic acid amplification assay for diagnosis of animal disease**. Alabama: Department of Agriculture and Industries, 1998. p. 150-158.

LEIB, D. A.; BRADBURY, J. M.; GASKELL, R. M.; HUGHES, C. S.; JONES R. C. Restriction endonuclease patterns of some European and American isolates of Avian Infectious Laryngotracheitis Virus. **Avian Diseases**, v. 30, n. 4, p. 835-837, 1986.

LEY, D. H. Mycoplasma gallisepticum infection. In: SAIF, Y. M.; BARNES, H. J.; GLISSON, J. R.; FADLY, A. M.; MCDUGALD, L. R.; SWAYNE, D. E. **Diseases of poultry**. 11. ed. Ames, IA: Iowa State University Press, 2003. p. 722-743.

LINARES, J. A.; BICKFORD, A. A.; COOPER, G. L.; CHARLTON B. R.; WOOLCOCK, P. R. An outbreak of Infectious Laryngotracheitis in California broilers. **Avian Diseases**, v. 38, n. 1, p. 188-192, 1994.

MAYO, M. A. A summary of the changes recently approved by ICTV. **Archives of Virology**, v. 147, n. 8, p. 1655-1656, 2002.

METTENLEITER, T. C. Pathogenesis of neurotropic herpesviruses: role of viral glycoproteins in neuroinvasion and transneuronal spread. **Virus Research**, v. 92, n. 2, p. 197-206, 2003.

METTENLEITER, T. C. Molecular biology of Pseudorabies (Aujeszky's disease) virus. **Comparative Immunological Microbiological Infectious Diseases**, v. 14, n. 2, p. 151-163, 1991.

NASCIMENTO, E. R.; YAMAMOTO, R.; HERRICK, K. R.; TAIT, R. Polymerase chain reaction for detection of *Mycoplasma gallisepticum*. **Avian Diseases**, v. 35, n. 1, p. 62-69, 1991.

NASCIMENTO, E. R.; YAMAMOTO, R.; KHAN, M. *Mycoplasma gallisepticum* F vaccien strain-specific polymerase chain reaction. **Avian Diseases**, v. 37, n. 1, p. 203-211, 1993.

ORTIZ, A.; KLEVEN, S. H. Serological detection of *Mycoplasma synoviae* infection in turkey. **Avian Diseases**, v. 36, n. 3, p. 749-752, 1992.

PANG, Y.; WANG, H.; GIRSHICK, T.; XIE, Z.; KHAN, M. Development and application of a multiplex polymerase chain reaction for avian respiratory agents. **Avian Diseases**, v. 46, n. 3, p. 691-699, 2002.

PRIDEAUX, C. T.; KONGSUWAN, K.; JOHNSON, M. A.; SHEPPARD, M. FAHEY, K. J. Infectious laryngotracheitis virus growth, DNA replication, and protein synthesis. **Archive Virology**, v. 123, n. 1-2, p. 181-192, 1992.

RADI, Z. A.; TRAMPEL, D. W.; SMITH, B. S.; ROSENBUSCH R. F.; GOLL, F. Immunohistochemical detection of *Mycoplasma gallisepticum* antigens in turkey respiratory tissues. **Avian Diseases**, v. 44, n. 2, p. 399-407, 2000.

ROIZMAN, B. *Herpesviridae* In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. **Fundamental virology**. 3. ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996. p. 2221-2230.

ROIZMAN, B. The family Herpesviridae: general description, taxonomy and classification. In: ROIZMAN, B. **The herpesviruses**. New York: Plenum Press, 1982. p. 1-23.

ROIZMAN, B.; SEARS, A. E. Herpes simplex viruses and their replication. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. **Fundamental virology**. 3. ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996. p. 2231-2296.

RUANO, M.; EL-ATTRACHE, J.; VILLEGAS, P. Efficacy comparisons of disinfectants used by the commercial poultry industry. **Avian Diseases**, v. 45, n. 1, p. 972-977, 2001.

SAGESSE, C. Bastos vence os desafios na produção de ovos. **Ave World**, v. 3, n. 16, p. 4-8, 2005.

SANDER, J. E.; THAYER, S. G. Evaluation of ELISA titers to Infectious Laryngotracheitis. **Avian Diseases**, v. 41, n. 2, p. 426-432, 1997.

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.

SCHOLZ, E.; PORTER, R. E.; GUO, P. Differential diagnosis of infectious laryngotracheitis from other avian respiratory disease by a simplified PCR procedure. **Journal of Virological Methods**, v. 50, n. 1-3, p. 313-321, 1994.

SELLERS, H.; GARCIA, M.; GLISSON, J.; BROWN, T.; SANDER, J.; GUY, J. Mild infectious Laryngotracheitis in broilers in Southeast. **Avian Diseases**, v. 48, n. 2, p. 430-436, 2004.

SMIETANKA, K. Re-emergence of Infectious laryngotracheitis in Poland. In: AVMA ANNUAL CONVENTION, 140., 2003, Colorado. **Convention notes...** Colorado: American Association of Avian Pathologists, 2003. p. 31.

SPEAR, P. G. Glycoproteins specified by herpes simplex virus. In: ROIZMAN, D. **The herpesviruses**. New York: Plenum, 1984. p. 64-78.

TIMURKAAN, N.; YILMAZ, F.; BULUT, H.; OZER, H.; BOLAT, Y. Pathological and immunohistochemical findings in broilers inoculated with a low virulent strain of Infectious Laryngotracheitis Virus. **Journal Veterinary Science**, v. 4, n. 2, p. 175-180, 2003.

TONG, G. Z.; ZHANG, S.; MENG, S.; WANG, L.; QIU, H.; WANG, Y.; YU, L.; WANG, M. Protection of chickens from infectious Laryngotracheitis with a recombinant fowlpox virus expressing glycoprotein B of infectious Laryngotracheitis Virus. **Avian Pathology**, v. 30, n. 2, p. 143-148, 2001.

VOGTLIN, A.; BRUCKNER, L.; OTTIGER, H. P. Use of polymerase chain reaction (PCR) for the detection of vaccine contamination by Infectious Laryngotracheitis Virus. **Vaccine**, v. 17, n. 20-21, p. 2501-2506, 1999.

WHETSTONE, C. A.; WHEELER, J. G.; REED, D. E. Investigation of possible vaccine-induced epizootics of infectious bovine rhinotracheitis, using restriction endonuclease analysis of viral DNA. **American Journal Veterinary Research**, v. 47, n. 8, p. 1789-1795, 1986.

WILD, M. A.; COOK, S.; COCHRAN, M. A genomic map of infectious laryngotracheitis virus and the sequence and organization of the gene present in the unique short and flanking regions. **Virus Genes**, v. 12, n. 2, p. 107-116, 1996.

WILLIAMS, R. A.; BENNET, 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 General Virology**, v. 73, n. 9, p. 2415-2430, 1992b.

WILLIAMS, R. A.; AL-AFALEQ, A. I.; JORDAN, F. T. W.; BRADBURY, J. M.; GASKELL, R. M.; BENNETT, M.; JONES, R. C. Pathogenicity of latent Infectious Laryngotracheitis Virus in chickens. **Avian Pathology**, v. 21, n. 2, p. 287-294, 1992a.

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, n. 4, p. 709-720, 1994.

YODER, H. W. Nonspecific reactions to Mycoplasma serum plate antigens induced by inactivated poultry disease vaccines. **Avian Diseases**, v. 33, n.1, p. 60-68, 1989.

YORK, J. J.; FAHEY, K. J. Humoral and cell-mediated immune responses to the glycoproteins of infectious laryngotracheitis herpesvirus. **Archives of Virology**, v. 115, n. 3-4, p. 289-297.

ZHAO, S.; YAMAMOTO, R. Detection of Mycoplasma synoviae by polimerase chain reaction. **Avian Pathology**, v. 22, n. 3, p. 533–542, 1993.