

RENATO LUÍS LUCIANO

**Vigilância epidemiológica dos vírus da influenza aviária, da doença
de Newcastle e da laringotraqueíte infecciosa das galinhas em
propriedades avícolas**

São Paulo

2020

RENATO LUÍS LUCIANO

Vigilância epidemiológica dos vírus da influenza aviária, da doença de Newcastle e da laringotraqueíte infecciosa das galinhas em propriedades avícolas

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Departamento:

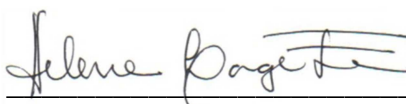
Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientadora:

Profa. Dra. Helena Lage Ferreira

De acordo: 

Orientadora

São Paulo

2020

Obs.: A versão original encontra-se disponível na Biblioteca da FMVZ/USP.

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

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

T. 4020
FMVZ

Luciano, Renato Luis

Vigilância epidemiológica dos vírus da influenza aviária, da doença de Newcastle e da laringotraqueíte infecciosa das galinhas em propriedades avícolas / Renato Luís Luciano. – 2020.

191 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2021.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientadora: Profa. Dra. Helena Lage Ferreira.

1. Influenza aviária. 2. Doença de Newcastle. 3. Laringotraqueíte infecciosa das galinhas. 4. Vigilância epidemiológica. 5. Sequenciamento de alto desempenho. I. Título.



Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

São Paulo, 25 de março de 2020
CEUA N 5201091216

Ilmo(a). Sr(a).
Responsável: Helena Lage Ferreira
Área: Epidemiologia Experimental Aplicada As Zoonoses

Título da proposta: "Vigilância epidemiológica dos vírus de influenza aviária, da doença de Newcastle e da laringotraqueíte infecciosa das galinhas em propriedades avícolas".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais FMVZ (ID 006036)

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Alteração do cadastro (versão de 18/março/2020) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "Venho por meio deste solicitar a alteração do título do projeto intitulado "Vigilância epidemiológica dos vírus de influenza aviária e da doença de Newcastle em aves de subsistência localizadas na região noroeste do estado de São Paulo", CEUAx N^o registrado em: 09/12/2016, para "[Vigilância epidemiológica dos vírus de influenza aviária, da doença de Newcastle e da laringotraqueíte infecciosa das galinhas em propriedades avícolas]". O projeto teve que ser redesenhado de acordo com os resultados parciais do estudo e o título que foi utilizado para cadastro do CEUA não condiz mais com o estudo atual. "

Comentário da CEUA: "Solicitação de alteração de título aprovada".

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Camilla Mota Mendes
Vice-Coordenador
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: LUCIANO, Renato Luís

Título: **Vigilância epidemiológica dos vírus da influenza aviária, da doença de Newcastle e da laringotraqueíte infecciosa das galinhas em propriedades avícolas**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

A Eliana, minha amada companheira nestes 24 anos de convivência, que sempre me incentivou, apoiou, confortou e me amparou nos momentos difíceis, dando todo o suporte necessário para que pudesse me dedicar a este desafiador projeto denominado “Doutorado”... palavras não são suficientes para expressar minha gratidão e amor por você!

Aos meus queridos filhos, Ana Clara e Pedro Henrique, pela compreensão nos diversos momentos em que tive que me ausentar para me dedicar a este trabalho. Que vocês possam extrair lições a respeito de empenho e dedicação e que respondam positivamente aos desafios que a vida lhes apresentar!

Aos meus pais, Márcio e Ivete (in memoriam) por terem sempre me estimulado a estudar e por me ensinarem os princípios de vida que me direcionam até hoje!

AGRADECIMENTOS

Gratidão... sentimento raro em meio a uma sociedade na qual as pessoas querem ser independentes e autossuficientes!

Para chegar até aqui, foi necessário contar com o apoio de diversas pessoas. A lista é grande, o espaço para os agradecimentos, pequeno...

Seria simples acrescentar: “A todos que contribuíram direta e indiretamente para que este trabalho fosse concluído com êxito: Muito obrigado!!!” Porém, seria injusto deixar de nomear todos aqueles que foram fundamentais nesta empreitada:

A Deus, o princípio e o fim de todas as coisas! Sou grato pelo sustento e capacitação diários e por dirigir meus caminhos e endireitar as minhas veredas.

A minha orientadora, Profa. Dra. Helena Lage Ferreira, por me direcionar neste trabalho em todas as etapas, com paciência e competência. Sua experiência me ensinou muito!

Aos meus antigos orientadores, Paulo Lourenço, Liana Brentano e Hélio Montassier, por me conduzirem nos caminhos científicos, acreditando em meu potencial.

Ao Instituto Biológico, representado pela Dra. Ana Eugênia de Carvalho Campos, por possibilitar o meu aperfeiçoamento como Pesquisador Científico, concedendo meu afastamento em regime parcial, sem o qual não poderia concluir este trabalho.

Ao Dr. Antonio Guilherme Machado de Castro, meu antigo diretor, por acreditar em mim e iniciar meu processo de afastamento para cursar o Doutorado.

A minha atual diretora, Dra. Ana Maria Iba Kanashiro, por finalizar meu processo de afastamento, sendo extremamente compreensiva em diversos momentos.

Aos colegas do CEAV – Descalvado, por entenderem minha ausência em várias situações, diante dos desafios de conciliar trabalho e vida acadêmica. Em especial, à Cynthia, Talitha e Laís, pela grande ajuda no setor de Biologia Molecular.

À Maristela Pituco e Líria Okuda, por me darem todo o apoio necessário e acreditarem que teria condições de desenvolver este projeto.

Ao Dr. Ricardo Harakava, pela ajuda na execução dos sequenciamentos, que foram fundamentais para o aprofundamento deste trabalho.

Ao Marcelo Candido, pelo auxílio na montagem e anotação do genoma completo, utilizado neste estudo.

Ao Dr. Stephen Spatz, do US National Poultry Research Center – USDA pelo apoio na elaboração da filogenia.

À Alice Ikuno, por me ajudar a desenvolver as primeiras reações de PCR para Laringotraqueíte e pela parceria no período em que realizamos o diagnóstico oficial para a CDA/SP.

A todos os funcionários da CDA/SP, representados pelo meu amigo, Luciano Lagatta, pelas coletas realizadas e pelo exemplo de amor e dedicação à profissão.

Ao Dr. Fernando Gomes Buchala, pelos conselhos e amizade. Você foi um grande apoiador para a realização deste Doutorado.

À Profa. Dra. Masaio Mizuno Ishizuka, pela amizade, apoio e exemplo de dedicação ao trabalho e por sua generosidade, demonstrada em vários momentos.

Aos meus amigos do MAPA, pela parceria firmada em todos esses anos como laboratório credenciado.

À Dilmara Reischak, pela amizade sempre constante e ajuda sempre necessária.

À equipe da Unidade de Sanidade Aviária do FDA/SP, pelos treinamentos nas metodologias oficiais de diagnóstico, que foram utilizadas neste trabalho.

Ao meu amigo, Fernando (de Nuporanga), por me ajudar em um momento difícil do doutorado, demonstrando que amizade se comprova com gestos e atitudes práticas.

Aos veterinários da COBB e Hy-Line, pela realização das coletas nas aves de subsistência, relacionadas ao monitoramento do Compartimento.

À Patricia Babadopulos e Karina Funabashi (Stabivet), pela grande ajuda com os kits de extração magnética de ácidos nucleicos.

À empresa NGS Soluções Genômicas, em especial à Marcela, pela realização do sequenciamento de alto desempenho.

Ao Comitê Estadual de Sanidade Avícola (COESA-SP), por me conceder o privilégio de integrar este grupo tão seleta, responsável por decisões tão importantes na avicultura paulista.

Ao Danival, secretário do VPS/FMVZ, pela competência e prontidão em me ajudar com as burocracias institucionais da Pós-graduação.

Ao Pr. Maurício Montagnero e aos membros da Igreja Batista Liber de Descalvado, pelas orações e apoio espiritual.

Aos meus irmãos, primos, tios e parentes, que torceram para que tivesse êxito nesta caminhada.

Aos profissionais do VPS / FMVZ / USP, pelo privilégio de ter feito meu aprimoramento acadêmico em uma das mais importantes Universidades do país.

Processo nº 2017/50334-3, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

“Combati o bom combate, terminei a corrida, guardei a fé”.

Bíblia Sagrada, 2 Timóteo 4, versículo 7

RESUMO

LUCIANO, R. L. **Vigilância epidemiológica dos vírus da influenza aviária, da doença de Newcastle e da laringotraqueíte infecciosa das galinhas em propriedades avícolas**. 2020. 191 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

A sanidade avícola é necessária para garantir a posição de destaque mundial da avicultura brasileira. O objetivo deste trabalho foi realizar a vigilância epidemiológica do vírus da IA (VIA) e do vírus da DNC (VDNC) em 2017 e 2018, além de avaliar a circulação de estirpes do vírus de laringotraqueíte infecciosa das galinhas (VLTi) nas granjas de postura comercial em duas regiões quarentemadas (Bastos e Guatapar) entre 2010 e 2018. Diferentes programas vacinais contra a LTI foram implementados na região, com a substituio de vacinas vivas atenuadas por recombinantes em 2012 (Bastos) e 2013 (Guatapar). Para a vigilância de VIA e VDNC foram coletados pools de suabes (traqueais e cloacais, n=220) de aves de subsistências localizadas no entorno de propriedades avícolas de reprodutoras. Essas amostras foram testadas pela reao de transcrio reversa-PCR em tempo real (RRT-PCR). O estudo longitudinal de VLTi coletou amostras de pools de suabes orofaríngeos de aves localizadas em Bastos (n=364) e Guatapar (n=214) para a deteco de VLTi por PCR. O sequenciamento de DNA dos genes ICP4, TK e genomas completos das amostras positivas foram realizados usando sequenciamento Sanger e sequenciamento de última gerao (NGS). As bibliotecas de DNA foram preparadas com o kit Nextera DNA Flex Library Prep e sequenciadas com o sequenciador MiSeq. Análise filogenética e as identidades genéticas foram inferidas com as sequências obtidas. Nosso estudo não detectou VIA e do VDNC em nenhuma das amostras no período avaliado. O VLTi foi detectado em 11,85% e 12,6% das amostras testadas de Bastos em 2013 e 2018. A região de Guatapar apresentou a maior taxa de deteco (60,5%) em 2010. A taxa de deteco de amostras testadas da região de Guatapar variou de 12,2% e 21,7% após 2013. Análise filogenética do gene ICP4 agrupou as sequências das amostras de Bastos com vacinas de CEO e outras sequências de Bastos detectadas em anos anteriores, com 99% da identidade genética entre estas sequências. As análises filogenéticas dos genes ICP4, TK e do genoma completo agruparam as amostras de Guatapar separadamente das amostras vacinais. A sequência completa do genoma de uma

amostra obtida de aves sintomáticas sem vacinação na região de Guatapar em 2010 (IB8098) teve 152.985 nucleotídeos, com 4755 leituras e 98,2% de cobertura. A análise filogenética agrupou a amostra IB8098 com outras estirpes virulentas, como da Rússia (MF405079). As identidades genéticas apresentaram 99,9%, quando comparadas à estirpe russa e 99,6% em relação às vacinais (CEO e TCO). Nosso estudo mostrou o VLTI ainda está presente nas regiões de Bastos e Guatapar, apesar das medidas de controle e vacinação vigentes. Os programas de vacinação nas regiões quarentenadas diminuíram a circulação do vírus com um leve aumento da detecção do VLTI com a utilização apenas das vacinas recombinantes. Esse é o primeiro relato da obtenção do genoma completo de VLTI no Brasil e sua caracterização genômica desde o início da circulação do vírus na região há pelo menos dez anos. O monitoramento contínuo da área é essencial para auxiliar as ações da defesa agropecuária, avaliar as medidas de vacinação implementadas contribuindo para a melhoria da sanidade avícola.

Palavras-chave: Influenza aviária. Doença de Newcastle. Laringotraqueíte infecciosa das galinhas. Vigilância epidemiológica. Sequenciamento de alto desempenho.

ABSTRACT

LUCIANO, R. L. **Epidemiological surveillance of avian influenza, Newcastle disease and infectious laryngotracheitis viruses in poultry farms.** 2020. 191 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Poultry health is important to ensure the world's leading position in Brazilian poultry production. The present study performed the epidemiological surveillance of avian influenza virus (AIV) and Newcastle disease virus (NDV) in 2017 and 2018; the circulation of virulent avian infection laryngotracheitis virus (ILTV) strains was also evaluated in commercial layer farms from two quarantined regions (Bastos and Guatapara) between 2010 and 2018. Different vaccine programs against ILT were established in the area, and a replacement of live vaccines by recombinant vaccines was done in 2012 (Bastos) and 2013 (Guatapara). For the AIV and NDV surveillance, swab pool samples (trachea and cloacal, n=220) were collected from backyard birds located closed to breeder farms. Real-time reverse-transcription polymerase chain reaction (RRT-PCR) tested these samples. The longitudinal study collected oropharyngeal swab pool samples from commercial layer chickens located in Bastos (n=364) and Guatapara (n=214) for virus ILTV detection by PCR. DNA sequencing from the ICP4, TK genes and complete genomes was performed in positive samples using Sanger sequencing and next-generation sequencing (NGS). DNA libraries were prepared with the Nextera DNA Flex Library Prep kit, sequenced with the MiSeq sequencer for NGS. Phylogenetic analysis and genetic identities were inferred using the obtained sequences. AIV and NDV were not detected in any sample during the study. ILTV was detected in 11.85% and 12.6% of tested samples from Bastos in 2013 and 2018. Guatapara region had the highest detection rate (60.5%) in 2010. The detection rate from tested samples of the Guatapara region ranged from 12.2% and 21.7% after 2013. Phylogenetic analysis based on ICP4 gene grouped sequences from Bastos samples with CEO vaccines and other sequences detected previously in Bastos, with 99% of nucleotide identity among them. Phylogenetic analysis based on ICP4, TK, and complete genomes grouped sequences from Guatapara separately from vaccine strains. The complete genome sequence of a sample (IB8098), collected from layer chickens displaying clinical signs without vaccination in the Guatapara region in 2010, had 152,985 nucleotides, with 4,755 reads and 98,2% coverage. The phylogenetic analysis grouped the IB8098 sample

with other virulent ILTV strains, such as from Russia (MF405079). Nucleotide identities were 99.9% compared to the Russian, and 99.6% to vaccine strains (CEO and TCO). Our study showed the ILTV is still present in the Bastos and Guatapara regions, despite the control and vaccination measures. The vaccination programs in the quarantine regions decreased the virus circulation, slightly increasing when only recombinant vaccines were applied. That is the first report of complete genome ILTV sequences in Brazil and its genomic characterization, after its circulation in the region for at least ten years. Continuous monitoring in poultry flocks is essential to help the poultry health measures, evaluate the vaccination programs placed in the area contributing to the Brazilian poultry health plans improvement.

Keywords: Avian influenza. Newcastle disease. Infectious laryngotracheitis. Epidemiological Surveillance. High-throughput sequencing.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática do VIA	28
Figura 2 – Representação esquemática dos mecanismos de antigenic drift e antigenic shift	29
Figura 3 – Distribuição mundial dos surtos de influenza aviária notificados à OIE....	37
Figura 4 – Municípios com pelo menos uma ave soropositiva no teste de ELISA para detecção de anticorpos contra o VIA, no estudo de avaliação da circulação dos VIA e VDNC, realizado pelo MAPA.....	39
Figura 5 – Representação esquemática do VDNC.....	43
Figura 6 – Distribuição mundial dos surtos de DNC notificados à OIE, no período de 01/2005 a 03/2020	50
Figura 7 - Últimos surtos de DNC ocorridos no Brasil	51
Figura 8 – Municípios com pelo menos uma ave, de criações comerciais, positiva ao teste de RRT-PCR para detecção do gene da proteína M do VDNC, no estudo de avaliação da circulação dos VIA e VDNC, realizado pelo MAPA	53
Figura 9 – Representação esquemática do VLTI	59
Figura 10 - Tipos de vacinas utilizadas em 77 países dos 104 países produtores de aves avaliados.....	68
Figura 11 - Surtos de LTI ocorridos no Brasil entre 2003 a 2020 e notificados à OIE	70
Figura 12 – Notificações e legislação relacionadas com a vacinação para LTI em Bastos (A) e Guatapar (B).....	74
Figura 13 - Localização das propriedades com aves de subsistência, no raio de 1 km dos diferentes tipos de propriedades avícolas.	81
Figura 14 - Localização das propriedades com aves de postura comercial.	85
Figura 15 - Diluio em série do RNA utilizado como controle positivo para validao da técnica de RRT-PCR para IA	90
Figura 16 – Diluio em série para validao da técnica de PCR para LTI	95
Figura 17 – Diluio em série para validao da técnica de qPCR LTI gC	97
Figura 18 – Parâmetros da validao para a reao RRT-PCR para IA	105
Figura 19– Resultados obtidos da prova de RRT-PCR para IA, a partir de pools de amostras de suabes traqueais e cloacais em aves de subsistência	107
Figura 20 – Parâmetros da validao para a reao RRT-PCR para DNC.....	108

Figura 21 – Resultados obtidos da prova de RRT-PCR para DNC, a partir de pools de amostras de suabes traqueais e cloacais em aves de subsistência	110
Figura 22 - Limite de Detecção (LD) do teste de PCR LTI ICP4	112
Figura 23 – Parâmetros da validação para a reação qPCR LTI gC	114
Figura 24 – Distribuição percentual das amostras, segundo as regiões estudadas	116
Figura 25 - Taxa de detecção do VLTI através do PCR LTI ICP4 nas duas regiões amostradas neste estudo	117
Figura 26 – Dinâmica do número de amostras testadas e percentual de positivos de VLTI detectados pela técnica de PCR LTI ICP4, no bolsão de Bastos (A) e Guatapar (B) entre 2010 e 2018.....	119
Figura 27 – Resultados das eletroforeses em gel de agarose das reações de PCR LTI para sequenciamento pelo método tradicional de Sanger	124
Figura 28 – Eletroforese capilar das bibliotecas das 13 amostras, geradas pelo Bioanalyzer.....	127
Figura 29 – Eletroferogramas das bibliotecas das 13 amostras, geradas pelo Bioanalyzer.....	128
Figura 30 – Curva padrão da reação de qPCR Kappa, para cáculo da concentração das amostras.....	129
Figura 31- Genoma Completo do VLTI obtido a partir da amostra ILTV/chicken/Brazil(Guatapara-SP)/IB8098/2010	134
Figura 32 - Análises filogenéticas do gene ICP4, baseadas no método Máxima Verossimilhança Likelihood com o modelo do GTR.....	137
Figura 33 - Análises filogenéticas do gene TK, baseadas no método Máxima Verossimilhança Likelihood com o modelo do GTR.....	139
Figura 34 - Análises filogenéticas do gene ICP4 (região localizada entre os nucleotídeos 115319 e 115889 do VLTI), utilizando o método Máximo Likelihood...	141
Figura 35 - Análises filogenéticas do gene TK (UL23), utilizando o método Máximo Likelihood.....	143
Figura 36 - Análises filogenéticas do genoma completo da amostra ILTV/chicken/Brazil(Guatapara-SP0/IB8098/2010, utilizando o método Máximo Likelihood.....	145

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Estirpes virais utilizadas como material de referência – controles positivos	87
Quadro 2 – Sequências dos oligonucleotídeos (primers e sonda) utilizados nas reações de RRT-PCR para detecção do gene M do VIA	89
Quadro 3 – Sequências dos oligonucleotídeos (primers e sonda) utilizados nas reações de RRT-PCR para detecção do gene M do VDNC.....	92
Quadro 4 – Sequências dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR convencional para detecção do gene ICP4 do vírus de LTI.....	94
Quadro 5 – Primers e sondas utilizadas no ensaio de PCR em tempo real do gene da glicoproteína C do vírus de LTI	96
Quadro 6 – Sequências dos oligonucleotídeos utilizados no sequenciamento dos genes ICP4 e TK do VLTI.....	99
Quadro 7 – Informações detalhadas dos genomas completos do VLTI disponíveis no GenBank (acesso em 06/09/2020), utilizados no alinhamento e análises filogenéticas do genoma completo da amostra IB8098/2010).....	146

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Notificações de surtos de LTI ocorridos no Brasil e reportados à OIE, no período de 2003 a 2020	71
Tabela 2 – Distribuição das amostras coletadas das aves para o diagnóstico molecular de IA, DNC e LTI, por espécies	78
Tabela 3 – Distribuição dos estabelecimentos com aves de subsistência localizadas no raio de 1 km entorno das propriedades avícolas com reprodutoras comerciais...82	
Tabela 4 – Relação das amostras de suabe traqueal coletadas para o diagnóstico molecular de LTI nas regiões de Bastos e Guatapar, no período de 2010 a 2018..84	
Tabela 5 – Amostragem coletada por especie e numero de aves.....	104
Tabela 6 – Limite de detecao da tecnica de RRT-PCR para IA.....	106
Tabela 7 – Limite de detecao da tecnica de RRT-PCR para DNC	109
Tabela 8 – Conversao das diluoes seriadas de base 5 para o exponencial na potencia 10, no LD do teste de PCR LTI ICP4	112
Tabela 9 – Limite de detecao da tecnica de qPCR gC para LTI.....	115
Tabela 10 – Percentual de amostras por cidade, submetidas ao PCR LTI ICP4	116
Tabela 11 – Detecao do VLTI atraves do PCR LTI ICP4, detalhamento por ano e regiao analisada	118
Tabela 12 – Distribuiao das amostras submetidas ao diagnostico do VLTI, atraves do PCR LTI ICP4, segundo a idade	121
Tabela 13 – Relao de amostras selecionadas para sequenciamento parcial dos genes ICP4 e TK do VLTI.....	123
Tabela 14 – Relao de amostras selecionadas para o sequenciamento NGS.....	126
Tabela 15 – Concentraao de amostras, a partir do qPCR Kappa.....	130
Tabela 16 – Resultado das sequencias do genoma completo das amostras, com as leituras mapeadas em relaao a sequencia JN542534 do VLTI (GenBank).....	131
Tabela 17 – Resultado das sequencias mapeadas em relaao a estirpe EU104911 (GenBank), para analise do gene ICP4.....	132
Tabela 18 – Resultado das sequencias mapeadas em relaao a estirpe DQ522947 (GenBank), para analise do gene TK.	133
Tabela 19 – Estimativa das identidades geneticas entre as sequencias em comparaao com a amostra IB8098/2010.....	147

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	27
2.1	INFLUENZA AVIÁRIA.....	27
2.1.1	Etiologia	27
2.1.2	Hospedeiros	29
2.1.3	Patogenicidade	30
2.1.4	Sinais clínicos e lesões.....	31
2.1.5	Transmissão	31
2.1.6	Diagnóstico	32
2.1.7	Estudos anteriores e cenário atual	33
2.1.8	Controle e monitoramento	40
2.2	DOENÇA DE NEWCASTLE	43
2.2.1	Etiologia	43
2.2.2	Diversidade Viral.....	45
2.2.3	Hospedeiros	45
2.2.4	Sinais clínicos e lesões.....	46
2.2.5	Transmissão	47
2.2.6	Diagnóstico	48
2.2.7	Estudos anteriores e cenário atual	49
2.2.8	Controle e monitoramento	53
2.3	LEGISLAÇÃO OFICIAL PARA CONTROLE DE IA E DNC (MAPA).....	55
2.4	LARINGOTRAQUEÍTE INFECCIOSA DAS GALINHAS.....	58
2.4.1	Etiologia	58
2.4.2	Diversidade Viral.....	60
2.4.3	Hospedeiros	60
2.4.4	Sinais clínicos e lesões.....	61
2.4.5	Transmissão	61
2.4.6	Diagnóstico	62
2.4.7	Legislação oficial para controle de LTI.....	64
2.4.8	Controle e monitoramento	65
2.4.9	Estudos anteriores e cenário atual	69

2.5	SEQUENCIAMENTO DE ALTO DESEMPENHO (NGS).....	75
3	OBJETIVOS	77
3.1	OBJETIVO GERAL.....	77
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	77
4	MATERIAIS E MÉTODOS	78
4.1	AMOSTRAS	78
4.1.1	Influenza aviária e doença de Newcastle.....	79
4.1.2	Laringotraqueíte infecciosa das galinhas	83
4.2	ANÁLISES LABORATORIAIS	86
4.2.1	Vírus utilizados como material de referência – controle positivos	86
4.2.2	Extração de ácidos nucleicos totais (DNA e RNA)	87
4.2.3	Extração de DNA (diagnóstico molecular de LTI).....	88
4.3	DIAGNÓSTICO MOLECULAR PARA DETECÇÃO DO GENE M DO VIA ...	89
4.3.1	Reação de Transcrição Reversa – PCR em tempo real para IA (RRT-PCR VIA)	89
4.3.2	Validação da técnica	90
4.3.2.1	Curva padrão	90
4.3.2.2	Limite de detecção.....	91
4.3.3	Interpretação dos resultados	91
4.4	DIAGNÓSTICO MOLECULAR PARA DETECÇÃO DO GENE M DO VDNC	91
4.4.1	Reação de Transcrição Reversa – PCR em tempo real para DNC (RRT-PCR DNC)	91
4.4.2	Validação da técnica	92
4.4.2.1	Curva padrão	92
4.4.2.2	Limite de detecção.....	93
4.4.3	Interpretação dos resultados	93
4.5	DIAGNÓSTICO MOLECULAR PARA DETECÇÃO DO VLTI.....	94
4.5.1	Reação de PCR convencional para detecção do gene ICP4 do VLTI (PCR-LTI-ICP4).....	94
4.5.1.1	Limite de detecção.....	94
4.5.1.2	Interpretação dos resultados	95

4.5.2	Reação de PCR em tempo real para detecção do gene da glicoproteína C do VLTI (qPCR LTI gC)	96
4.5.2.1	Curva padrão.....	97
4.5.2.2	Limite de detecção.....	98
4.5.2.3	Interpretação dos resultados.....	98
4.6	SEQUENCIAMENTO POR SANGER.....	98
4.7	SEQUENCIAMENTO DE ALTO DESEMPENHO (NGS).....	99
4.7.1	Seleção de amostras	99
4.7.2	Pré-tratamento das amostras	99
4.7.3	Quantificação do DNA das amostras	100
4.7.4	Preparo das bibliotecas para o NGS	100
4.7.5	Montagem do genoma	101
4.7.6	Análises Filogenéticas	101
5	RESULTADOS	103
5.1	AMOSTRAS.....	103
5.1.1	Influenza aviária e doença de Newcastle	103
5.1.2	Laringotraqueíte infecciosa das galinhas	104
5.2	DIAGNÓSTICO MOLECULAR PARA DETECÇÃO DO GENE M DO VIA – RRT-PCR IA.....	104
5.2.1	Validação da técnica de RRT-PCR IA	104
5.2.1.1	Curva padrão.....	104
5.2.1.2	Análise dos resultados de RRT-PCR IA.....	106
5.3	DIAGNÓSTICO MOLECULAR PARA DETECÇÃO DO GENE M DO VDNC.....	108
5.3.1	Validação da técnica de RRT-PCR para DNC	108
5.3.1.1	Curva padrão.....	108
5.3.1.2	Limite de detecção.....	109
5.3.1.3	Análise dos resultados de RRT-PCR para DNC.....	109
5.4	DIAGNÓSTICO MOLECULAR PARA DETECÇÃO DO VLTI.....	111
5.4.1	PCR – LTI – ICP4	111
5.4.1.1	Validação da técnica.....	111
5.4.1.2	Limite de detecção.....	111
5.4.2	qPCR LTI gC	113

5.4.2.1	Validação da técnica.....	113
5.4.2.2	Curva padrão.....	113
5.4.2.3	Limite de detecção.....	114
5.4.3	Análise dos resultados do diagnóstico molecular do VLTl.....	115
5.4.3.1	PCR – LTI – ICP4.....	115
5.4.3.2	qPCR LTI gC.....	122
5.5	SEQUENCIAMENTO POR SANGER.....	122
5.6	SEQUENCIAMENTO NGS.....	125
5.6.1	Seleção de amostras e quantificação do DNA.....	125
5.6.2	Determinação do tamanho das bibliotecas para o sequenciamento NGS	127
5.7	MONTAGEM DO GENOMA COMPLETO – AMOSTRA ILTV/CHICKEN/BRAZIL(GUATAPARA-SP)/IB8098/2010).....	133
5.8	ANÁLISES FILOGENÉTICAS.....	135
5.8.1	Análises filogenéticas do gene ICP4 – SANGER.....	135
5.8.2	Análises filogenéticas do gene TK – SANGER.....	138
5.8.3	Análises Filogenéticas dos genes ICP4 e TK – NGS.....	140
5.8.3.1	Gene ICP4.....	140
5.8.3.2	Gene TK.....	142
5.8.4	Análise Filogenética da amostra ILTV/chicken/Brazil(Guatapara- SP)/IB8098/2010.....	144
6	DISCUSSÃO.....	148
7	CONCLUSÕES.....	156
8	REFERÊNCIAS.....	157

1 INTRODUÇÃO

A avicultura brasileira ocupa posição de destaque no cenário nacional e internacional. Em 2019, a produção brasileira de carne de frango superou a marca de 13,24 milhões de toneladas, tornando o país terceiro maior produtor mundial, atrás apenas da China – segundo colocado com 13,75 milhões – e EUA, primeiro colocado com 19,94 milhões. Aproximadamente 68% desta produção permanecem no mercado interno, enquanto que 32% são destinados às exportações. Segundo dados da Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA), o Brasil é o maior exportador mundial de carne de frango com a comercialização de 4,21 milhões de toneladas para mais de 160 países, gerando uma receita de 6,99 milhões de dólares a economia nacional. Esta posição de liderança é ocupada pelo país desde 2004 (ABPA, 2020).

No ano de 2019, a produção brasileira de ovos comerciais foi de 49,05 bilhões de unidades, sendo que 99,59% foram destinadas ao mercado interno e 0,41% (correspondente a 7,69 mil toneladas) foi exportada para mais de 60 países, gerando uma receita de 10,63 milhões de dólares ao país. São Paulo é o principal estado produtor de ovos, com aproximadamente 30% da produção nacional, sendo que o município de Bastos, localizado no interior paulista é responsável por 11,81% da produção nacional, com uma média de cinco bilhões de ovos por ano (SÃO PAULO 2019a; ABPA, 2020).

Os índices citados acima só são alcançados no Brasil, devido ao elevado nível de sanidade em todos os segmentos da produção avícola. Com a globalização, os mercados consumidores se tornaram cada vez mais exigentes, gerando barreiras comerciais e sanitárias (SALANI, 2006). Para continuar liderando as exportações neste segmento, é necessário ter um controle cada vez maior em relação à ocorrência de doenças na avicultura.

As doenças respiratórias estão associadas na avicultura a grandes perdas econômicas em todo o mundo, sendo as enfermidades virais reconhecidas como o maior desafio da avicultura moderna, devido ao fato de apresentarem altas taxas de transmissão e, assim, importância socioeconômica e relevância em tratados internacionais no comércio de animais e produtos (ROUSSAN; HADDAD; KHAWALDEH, 2008; SHANKAR, 2008).

Um dos fatores que predispõe à fácil transmissão destas doenças é o sistema de criação intensivo das aves no qual grande população vive em espaços confinados, nestas condições a entrada de um patógeno, especialmente viral, pode causar alta morbidade ou letalidade (MORLEY; THOMSON, 1984). Além disso, as doenças respiratórias em aves de produção são geralmente multifatoriais, ou seja, podem apresentar diversos agentes envolvidos. Estas doenças podem causar sinais respiratórios como dispneia, tosse com expectoração (alguns casos, com secreção sanguinolenta) e descarga nasal, conjuntivite, edema dos seios infraorbitários. Além disso, podem também causar queda na produção de ovos quando afetam poedeiras e matrizes, provocando grandes perdas econômicas.

O Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA), criado em 1994 pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), foi um marco em relação ao controle de enfermidades consideradas emergenciais (BRASIL, 1994). O programa traz uma legislação importante para toda a avicultura brasileira que visa o controle de enfermidades, como influenza aviária (IA), doença de Newcastle (DNC) e laringotraqueíte infecciosa das galinhas (LTI) (BRASIL, 2006; 2018). Tais enfermidades são de notificação obrigatória ao serviço veterinário oficial (SVO), segundo a Instrução Normativa (IN) nº 50, de 24 de setembro de 2013 (BRASIL, 2013b).

Atualmente, o Brasil é um país considerado livre de influenza aviária (subtipos H5 e H7) e um status de país livre do vírus da doença de Newcastle velogênico nas criações de aves comerciais. Os últimos casos da doença de Newcastle foram notificados em criações de aves não comerciais, em 2006, nos estados do Rio Grande Sul, Amazonas e Mato Grosso (OIE, 2020f). Dentre os fatores que corroboram para este fato, destaca-se o elevado índice de biossegurança adotado no setor avícola, atrelado a uma legislação sanitária moderna e que acompanha a evolução do setor. Tal fato mantém o país em uma posição privilegiada em relação ao comércio internacional. Tais doenças são responsáveis por acarretar grandes prejuízos à avicultura industrial (SCHERER et al., 2011).

A vigilância ativa para DNC e a pronta atuação nos focos que ocorreram no país fizeram com que a enfermidade fosse controlada rapidamente. Tais medidas precisam ser mantidas para evitar o surgimento de novos casos. A vacinação tem sido utilizada como forma de controle dos surtos de DNC e a adoção de medidas

profiláticas complementares (BRASIL, 2002; 2006; FLORES et al., 2006; BRASIL, 2007b; a; ORSI et al., 2010b; BRASIL, 2012b).

Outro importante agente viral responsável por doenças respiratórias agudas em aves é o vírus da laringotraqueíte infecciosa das galinhas (VLTi). A laringotraqueíte infecciosa causada pelo VLTi era considerada como doença exótica no Brasil até 2002, apesar de evidências sorológicas demonstrando a circulação do vírus anteriormente (HIPÓLITO et al., 1974; VARGAS, 1995). Em dezembro de 2002, foi notificada pela primeira vez no Brasil na região de Bastos, onde causou elevados prejuízos à cadeia (ITO et al., 2003; CHACÓN et al., 2007; BUCHALA, 2008). No final de 2009, foi notificada à Coordenadoria de Defesa Animal a suspeita de ocorrência de LTI nas Granjas do Núcleo Colonial Guatapar do Bairro de Mombuca. Amostras foram encaminhadas ao Instituto Biológico de São Paulo e os resultados obtidos nas provas laboratoriais (ELISA, IDGA – imunodifusão em gel de gar, PCR e histopatologia) indicaram haver uma ampla circulao viral nas aves das granjas existentes na área geográfica investigada (LUCIANO et al., 2011; LUCIANO et al., 2012; FARRA, 2014).

Em novembro de 2010, um novo surto foi identificado no Sul do estado de Minas Gerais (PREIS et al., 2013). Desde o começo dos surtos no Brasil foram liberadas vacinas vivas atenuadas (cultura de células e de embrião) no estado de São Paulo. Mais recentemente estas vacinas não são mais utilizadas e apenas as vacinas vetorizadas têm sido utilizadas nos três bolsões para o controle da doença.

Outro aspecto a ser destacado é a necessidade da gerao de informaes epidemiológicas relacionadas com as populaes de aves de subsistência, especialmente nas propriedades localizadas entorno de granjas avícolas, uma vez que a capacidade de transmissão de patógenos varia de acordo com a susceptibilidade do hospedeiro, sinais clínicos, taxa de transmissão e as características de interao entre aves domésticas e silvestres (BROOKES et al., 2009; WOODFORD, 2009). Diferenças nas condies ambientais e nas práticas de biosseguridade influenciam as populaes de aves próximas a granjas avícolas, contribuindo para a disseminao de patógenos para as aves domésticas (GUIMARÃES et al., 2016).

O diagnóstico viral destas três enfermidades é baseado no isolamento viral em ovos embrionados livres de patógenos específicos (SPF) com 9 a 11 dias de

incubação, histopatológico e em testes de diagnóstico molecular como ensaios de PCR, RT-PCR e sequenciamento (OIE, 2012b).

No Brasil há alguns estudos que detectaram ou isolaram o vírus da influenza aviária (VIA) e o vírus da doença de Newcastle (VDNC) e/ou encontraram títulos de anticorpos contra esses vírus em aves migratórias, silvestres e de subsistência. Porém não foram detectados VIA de alta patogenicidade, nem tampouco VDNC de notificação obrigatória (ORSI, 2010; ORSI et al., 2010b; MOTA et al., 2013; DE ARAUJO et al., 2014; REISCHAK et al., 2015).

Uma ferramenta utilizada para a compreensão da epidemiologia molecular de agentes virais é o sequenciamento do genoma de microrganismos, através da metodologia tradicional, denominada Sanger. Existem diversas publicações, com o sequenciamento tradicional de porções do fragmento dos genomas virais de VIA, VDNC e VLTI, utilizadas para realizar esta comparação (ALDOUS et al., 2003; CREELAN et al., 2006; CZEGLEDI et al., 2006; KIRKPATRICK et al., 2006; CALLISON et al., 2009; CATTOLI et al., 2010; JONGES et al., 2011; DUNDON et al., 2012; LEE et al., 2013; QI et al., 2018). A caracterização dos genomas virais também pode ser realizada pela técnica de sequenciamento de alto desempenho, também conhecido como NGS, que permite o sequenciamento do genoma completo de várias estirpes virais em um período curto de tempo e com custo de 15 a 20 vezes mais baixo que o método Sanger (DIMITROV et al., 2017a). Com o sequenciamento completo dos agentes circulantes é possível realizar análises filogenéticas entre todos os genes. Esta potente ferramenta pode ser utilizada para investigar a possível origem e transmissão dos vírus em um surto destas doenças notificáveis (LEE et al., 2017).

A caracterização molecular de amostras brasileiras do VIA já foi descrita através do sequenciamento tradicional e por NGS (DE ARAUJO et al., 2014; HURTADO et al., 2015; ARAUJO et al., 2018). Da mesma forma, também foram publicados estudos referentes à caracterização de estirpes do VDNC, tanto virulentas como não virulentas, isoladas no Brasil (THOMAZELLI et al., 2012; FERNANDES et al., 2014; VAN BORM et al., 2016).

Em relação ao VLTI, existem alguns estudos realizados para a caracterização dos vírus circulantes nas áreas endêmicas de LTI (VILLARREAL et al., 2004; CHACON; FERREIRA, 2009; CHACON; MIZUMA; PIANTINO FERREIRA, 2010; PREIS et al., 2013; COUTO et al., 2015) e em outras áreas produtoras de ovos no

Brasil (CHACON et al., 2015). Esses autores utilizaram a técnica de sequenciamento por Sanger para análises do gene da proteína reguladora da transcrição (ICP4) e da proteína timidina quinase (TK), dentre outros.

Este estudo objetivou realizar a vigilância epidemiológica do VIA e do VDNC em aves de subsistência, localizadas entorno de propriedades avícolas de reprodutoras, provenientes de três municípios do estado de São Paulo e do VLTI em poedeiras comerciais de duas áreas endêmicas do estado de São Paulo. A partir dos dados obtidos foram utilizadas técnicas de sequenciamento tradicional e NGS, com a finalidade de realizar a caracterização molecular dos vírus detectados. Desta forma, foram gerados dados epidemiológicos referentes à circulação das estirpes virais desses patógenos nas regiões avaliadas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 INFLUENZA AVIÁRIA

2.1.1 Etiologia

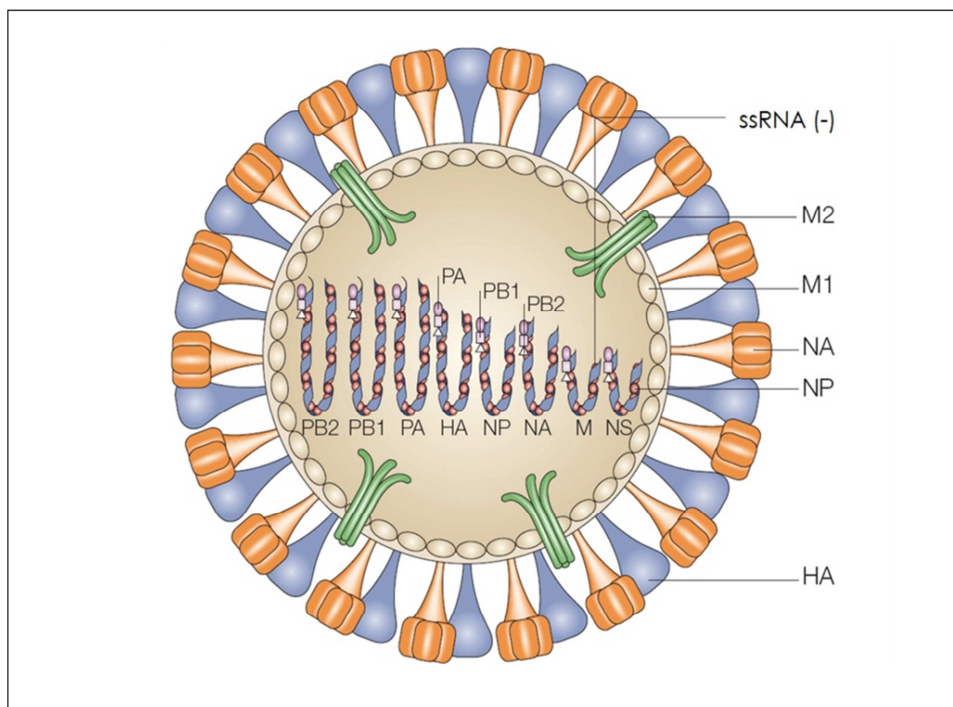
Segundo a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), a IA é uma infecção em aves domésticas ou em produtos derivados de aves domésticas, causada por qualquer vírus de influenza do tipo A (VIA) pertencente aos subtipos H5 ou H7 ou por qualquer vírus de influenza A com um índice de patogenicidade intravenosa (IVPI) maior que 1,2 (ou, ainda, com mortalidade maior que 75%). Os vírus H5 e H7 que não apresentarem esses critérios devem ser sequenciados, para determinação da sequência de aminoácidos no sítio de clivagem da hemaglutinina 0 (HA0) (OIE, 2015). Se a sequência de aminoácidos que for observada (múltiplas substituições ou inserções de aminoácidos básicos, como arginina ou lisina), for similar às sequências descritas de isolados de alta patogenicidade (IAAP), o isolado deve ser classificado como de alta patogenicidade. Os surtos em aves domésticas causados pelo vírus da IA, classificados como estirpes virais de alta patogenicidade ou pelos vírus dos subtipos H5 e H7, incluindo vírus de influenza aviária de baixa patogenicidade (IABP), devem ser notificados imediatamente ao Serviço Veterinário Oficial e à Organização Mundial de Saúde Animal (OIE, 2015).

O vírus influenza A pertence à família *Orthomyxoviridae*, gênero *Alphainfluenza virus* (ICTV, 2019), composta por vírus envelopados, com morfologia esférica e pleomórfica, tamanho aproximado de 120 nm. Os vírus apresentam três glicoproteínas de superfície em seu envelope viral: a hemaglutinina (HA), neuraminidase (NA) e matriz (M). O genoma é constituído por 8 segmentos de RNA, de fita simples com polaridade negativa, tamanho aproximado de 13,5 Kb e que codificam pelo menos onze proteínas estruturais: segmento 1 (PB1, PB1-F2), segmento 2 (PB2), segmento 3 (PA), segmento 4 (HA), segmento 5 (NP), segmento 6 (NA), segmento 7 (M1, M2), e segmento 8 (NS1 e NEP-NS2) (CHEN et al., 2001; CHEN et al., 2006; SWAYNE; SUAREZ; SLIMS, 2013; LEE et al., 2017; KARIITHI et al., 2020) (Figura 1).

Os vírus de influenza aviária apresentam 16 diferentes tipos de HA e 9 tipos de NA, que são encontrados em diferentes espécies de aves. A combinação das

proteínas de superfície HA e NA denomina os subtipos dos isolados virais, como H5N1 (PALESE; SHAW, 2007; SWAYNE; SPACKMAN, 2013; SCHRAUWEN et al., 2014).

Figura 1 – Representação esquemática do VIA



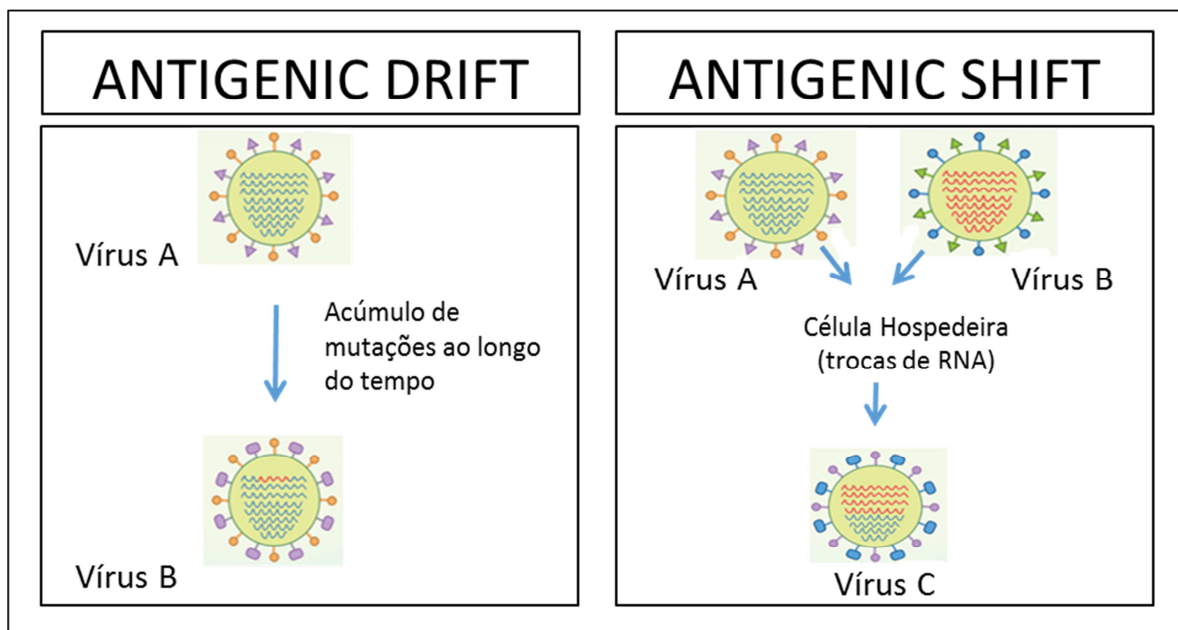
Fonte: Adaptado de Clancy (2008).

A hemaglutinina é responsável pela evasão na célula hospedeira, através da ligação ao ácido siálico presente na superfície celular da mesma e a neuraminidase permite a liberação de novas partículas virais, sendo alvo de anticorpos neutralizantes.

Durante a replicação viral, erros ocasionados pela ação da RNA polimerase viral causam constantes variações antigênicas do VIA, sendo responsáveis pela evolução dos vírus, além de permitir a reinfecção (BROWN, 2000). Existem duas formas de evolução do VIA. *Antigenic drift*, definida como variações antigênicas graduais que ocorrem através de mutações pontuais no genoma viral, como descrito em diferentes estirpes virais, incluindo aquelas pertencentes aos subtipos H5 e H7 do VIA (LEE; SENNE; SUAREZ, 2004; TERREGINO et al., 2010; YOUK et al., 2019). A segunda forma, *antigenic shift*, é o mecanismo no qual ocorre o rearranjo gênico de diferentes vírus de VIA, quando uma mesma célula hospedeira é infectada por dois ou mais vírus. Tal fato acarreta a uma completa modificação na estrutura

antigênica viral e a emergência de novos subtipos virais. Tal mecanismo pode resultar em um novo vírus, como relatados em pandemias graves (ABDELWHAB; VEITS; METTENLEITER, 2013) (Figura 2).

Figura 2 – Representação esquemática dos mecanismos de antigenic drift e antigenic shift



Fonte: Adaptado de Aryal (2018).

2.1.2 Hospedeiros

Aves aquáticas de vida livre são os reservatórios naturais do VIA, sendo que ocorre um ciclo de infecção dinâmico entre estas aves, muitas delas migratórias, e outras espécies de aves e animais (SWAYNE; HALVORSON, 2003). Tal fato revela a importância de se realizar a vigilância epidemiológica de IA no Brasil, uma vez que as aves silvestres são importantes fontes de infecção, representando um risco de introdução e da disseminação do vírus, a partir das rotas de aves migratórias (STALLKNECHT, 2007). Uma grande variedade de espécies de aves (em torno de 100) pertencentes a mais de oito ordens, tanto de aves domésticas, perus e galinhas, quanto de aves silvestres são suscetíveis ao VIA, que podem ser assintomáticas ou apresentar sinais clínicos leves a graves. A suscetibilidade pelo vírus é variável, sendo os perus mais suscetíveis que as galinhas (SWAYNE; SUAREZ; SLIMS, 2013).

Algumas estirpes do VIA são capazes de infectar mamíferos, como humanos, gatos, cães, cavalos e suínos, sendo que a possibilidade de estirpes aviárias sofrerem rearranjos genéticos com vírus humanos também deve ser considerada (CAPUA, I.; ALEXANDER, 2004).

2.1.3 Patogenicidade

A composição molecular da proteína HA dos vírus de influenza aviária é fator determinante quanto à indução do grau de infectividade e patogenicidade viral, intimamente relacionados com a clivagem da proteína HA0 em HA1 e HA2. A clivagem da proteína HA0 em HA1 e HA2 é determinante para a replicação viral. A sequência de aminoácidos na forma não clivada de HA0 pode ser reconhecida por dois tipos de proteases: i) quando há a presença de até 3 aminoácidos básicos, o sítio de clivagem é reconhecido por proteases do tipo tripsina, localizadas apenas nas células epiteliais (principalmente trato digestório e respiratório); ii) quando há presença de múltiplos aminoácidos básicos (R-Arginina ou K-lisina), o sítio de clivagem é reconhecido por proteases do tipo furina (localizadas em todas as células). Porém, a patogenicidade dos isolados não é influenciada apenas pela HA, uma vez que outras proteínas também são relacionadas ao aumento de patogenicidade do vírus, tais como PB1, PB1-F2, PB2, PA, NA, M1, M2, NS1 e NEP-NS2 (HATTA et al., 2001; SHINYA et al., 2004; LI et al., 2005; HULSE-POST et al., 2007; JIAO et al., 2008; FAN et al., 2009; PAN; JIANG, 2009; LI et al., 2011; DANKAR et al., 2013).

Os subtipos H5 e H7 de IABP podem espontaneamente sofrer mutações após passagens em aves domésticas, tornando-se influenza aviária de IAAP (ABDELWHAB; VEITS; METTENLEITER, 2013). O surgimento dos vírus de IAAP é baseado na mutação dos vírus de IABP, a partir de alterações no sítio de clivagem proteolítico da hemaglutinina, que incluem mutações de múltiplos aminoácidos não básicos por básicos, duplicação de aminoácidos básicos ou recombinação com inserção de aminoácidos celulares ou virais, de forma que IAAP pode surgir a partir de estirpes avirulentas (GARCIA et al., 1996; GARTEN; KLENK, 2008; LEE; CRIADO; SWAYNE, 2020). Baseado na patogenicidade do vírus em galinhas, a maioria dos VIA que circulam em aves domésticas causam uma doença respiratória branda (isto é, IABP), porém pode haver uma alteração quando há infecções

secundárias ou coinfeções com doenças imunossupressoras. Já apenas os subtipos H5 e H7 dos VIA são identificados como IAAP e podem causar uma doença sistêmica grave com mortalidade de até 100% (SWAYNE; PANTIN-JACKWOOD, 2008; GOWTHAMAN et al., 2017; LEE; CRIADO; SWAYNE, 2020).

2.1.4 Sinais clínicos e lesões

Os sinais clínicos e lesões variam de acordo com a espécie, idade, características da estirpe do VIA envolvida, fatores ambientais e suscetibilidade das aves (SPICKLER; TRAMPEL; ROTH, 2008; SWAYNE; SUAREZ; SLIMS, 2013).

Os sinais podem ser variáveis, desde nenhum sinal clínico aparente a quadros com sintomatologia respiratória, digestória ou neurológica, apresentando sinais como descarga nasal e ocular, tosse, dispneia, inchaço dos seios da face e/ou cabeça, apatia, vocalização reduzida, perda de apetite, cianose da pele, edema de crista e barbela, incoordenação, paralisia, sinais nervosos e diarreia. Em aves de postura ocorre uma acentuada queda de postura e piora na qualidade dos ovos produzidos (HOOPER et al., 1998; ELBERS; KOCH; BOUMA, 2005; SWAYNE; PANTIN-JACKWOOD, 2006; SWAYNE, 2007).

O vírus pode causar uma infecção aguda ou pode causar uma doença sistêmica e altamente fatal que afeta a maioria dos órgãos, com morbidade e mortalidade até 100%. Em outros casos, pode ocorrer mortalidade baixa (menor que 5%), com sinais respiratórios brandos e aves de postura apresentam quedas na produção, sendo mais comum em aves mais velhas. As lesões ocorrem no trato respiratório, reprodutivo, rins ou pâncreas, podendo ocorrer infecções bacterianas secundárias, o que geralmente agravam o quadro (HOOPER et al., 1998; ZIEGLER et al., 1999; CAPUA et al., 2000; SWAYNE; SUAREZ; SLIMS, 2013).

2.1.5 Transmissão

A transmissão ocorre por contato direto entre as aves suscetíveis com aves, após o contato de aves suscetíveis com secreções nasais, oculares e excretas contendo o vírus eliminado de aves infectadas ou de forma indireta através do contato com água, alimentos, fômites, pessoas, equipamentos, vestimentas materiais, veículos, produtos, insetos, roedores e outras pragas, cama de aviário,

esterco e carcaças contaminadas com partículas virais (SWAYNE; HALVORSON, 2008). O período de incubação varia de 3 a 21 dias em aves domésticas, sendo influenciada por diversos fatores: via de infecção, dose infectante, patogenicidade do vírus, além da idade e espécies das afetadas (SWAYNE, 2008; OIE, 2015).

2.1.6 Diagnóstico

O diagnóstico clínico desta doença é extremamente difícil por não haver lesão patognomônica. A confirmação da presença do vírus pode ser feita pelo isolamento viral e identificação do ácido nucleico do agente. Também foram desenvolvidos testes rápidos para diagnóstico a detecção de influenza, com elevada sensibilidade e especificidade (SUAREZ; DAS; ELLIS, 2007; CHEN et al., 2008; WIBOWO et al., 2016; YEO et al., 2017). O isolamento viral em ovos embrionados é utilizado para a confirmação da infecção, ou seja, da partícula viral infecciosa, e é considerado o teste de referência ou "*gold standard*". O isolamento viral pode demorar de 3 a 21 dias, sendo necessária de duas a três passagens cegas para o crescimento do vírus (OIE, 2017a).

A presença do vírus de influenza pode ser confirmada através do uso de RT-PCR (transcrição reversa, seguida da reação em cadeia da polimerase) ou Real time-RT-PCR (transcrição reversa, seguida da reação de PCR em tempo real - RRT-PCR), utilizando primers de regiões conservadas do genoma viral (ALTMÜLLER et al., 1992; SPACKMAN et al., 2002; SPACKMAN et al., 2003; CHAN et al., 2006; CH et al., 2007; CHEN et al., 2007). O diagnóstico molecular do VIA é normalmente realizado através da RT-PCR ou RRT-PCR e a caracterização ocorre através do sequenciamento. A detecção de influenza A por amplificação de sequências em regiões conservadas do gene M mostrou ser 100 vezes mais sensível do que o isolamento viral convencional (FOUCHIER et al., 2000). Foram descritos protocolos de real time PCR para detecção dos genes M, H5 e H7, respectivamente do VIA, utilizando sondas fluorogênicas com elevada capacidade de detecção (SPACKMAN et al., 2002). Um método rápido, sensível e específico foi descrito para subtipagem das nove neuraminidases (NA 1-9) do VIA, através de um ensaio multiplex de RRT-PCR, com redução no número de reações de PCR (de 9 para 3) (SUN et al., 2017). Porém estes testes podem apresentar resultados falsos negativos, devido a alta

variabilidade dos genes do VIA e dos protocolos utilizados (LACONI et al., 2020; SPACKMAN, 2020).

Provas sorológicas, tais como imunodifusão em gel de ágar (IDGA), inibição de hemaglutinação e o ensaio imunoenzimático ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*), no formato indireto ou competitivo, são utilizadas para detecção de anticorpos (SWAYNE; SPACKMAN, 2013). O teste de inibição de hemaglutinação (HI) e inibição de neuraminidase (IN) são utilizados para a subtipagem do vírus, utilizando um painel de antissoros mono-específicos das 16 hemaglutininas (HA 1-16) e das nove neuraminidases (NA1-9) dos subtipos do VIA, sendo também utilizados na identificação do isolado viral (OIE, 2015).

O Laboratório Federal de Defesa Agropecuária (LFDA), localizado em Campinas, é o laboratório de referência da OIE na América do Sul e utiliza as metodologias internacionais para o diagnóstico confirmatório do VIA (incluindo o isolamento e identificação do vírus, determinação do índice de patogenicidade intravenoso – IPIV, técnicas sorológicas e moleculares). O MAPA também autorizou o credenciamento de laboratórios estaduais para realização do diagnóstico de triagem do VIA, através de provas sorológicas (IDGA e ELISA) e moleculares (RRT-PCR para o gene M do VIA) (SDA-MAPA, 2014). No estado de São Paulo, o único laboratório credenciado é o Centro Avançado de Pesquisa Avícola, do Instituto Biológico, localizado em Descalvado.

2.1.7 Estudos anteriores e cenário atual

A primeira descrição do VIA em aves foi de um vírus IAAP, denominado peste aviária (*fowl plague*), identificado no norte da Itália em 1880, por Edoardo Perroncito (KALETA; RÜLKE, 2008). De 1880 a 1859, a peste aviária foi disseminada pela Europa, Ásia e África e também foi descrita nas Américas (Norte e Sul) (LEE; CRIADO; SWAYNE, 2020).

No período de 1959 a 1995 foram descritos 15 surtos de IAAP: Escócia (1959), África do Sul (1961), Inglaterra (1963), Canadá (1966), Austrália (1976), Alemanha (1979), Inglaterra (1979), EUA (1983-84), Irlanda (1983), Austrália (1985), Inglaterra (1991), Austrália (1992, 1994-95), México (1994-95) e Paquistão (1994-95) (LEE; CRIADO; SWAYNE, 2020). A estimativa do impacto da IAAP nos países

afetados varia bastante, conforme a estrutura do setor avícola, a rapidez no controle do surto e o método utilizado para estimar os impactos (OIE, 2015).

Em 1996, foi isolado o vírus IAAP (H5N1), em um ganso na província de Guangdong, responsável por uma pandemia, que atingiu 84 países na Ásia, África, Europa e América do Norte, e que ainda tem se mantido em aves domésticas e aves aquáticas (reservatórios), produzindo infecções em aves ou humanos. Em alguns países, o vírus se tornou endêmico na avicultura industrial, com a morte a abate de 250 milhões de aves, incluindo as aves que atuaram como reservatórios do vírus (SWAYNE; SUAREZ; SIMS, 2020).

No final de 2014, um vírus H5N8 IAAP pertencente ao subclado 2.3.4.4 foi identificado na Coreia do Sul e depois disperso para China (H5N6), Rússia (H5N8), Japão (H5N8) e Europa (H5N8) (PAN et al., 2016). Estas diferentes combinações do vírus de IAAP H5Nx que emergiram na Ásia e se espalharam para outros países da Ásia, Europa e América do Norte, incluindo Canadá (H5N2), China Lao (H5N6) e Estados Unidos (H5N1, H5N2 e H5N8). Novos eventos de H5N1 foram reportados no Egito, China, Índia, Nigéria, Rússia, Israel e Palestina (OFFLU, 2015). Entre 2015 e 2016, ocorreu na França, um surto de IAAP causado pela recombinação do H5 asiático com as neuraminidases dos vírus de IABP euroasiáticos, originando dois subtipos (H5N2 e H5N9) de IAAP (BRIAND et al., 2017).

Os surtos de H5N2 (IAAP) registrados nos Estados Unidos, entre dezembro de 2014 e junho de 2015, foram responsáveis pela maior e mais onerosa emergência sanitária da história do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA - *U.S. Department of Agriculture*) com o sacrifício de 49,6 milhões de aves. Os surtos afetaram 21 estados norte-americanos, 232 propriedades avícolas (comerciais e de subsistência), acarretando um prejuízo de 1,3 bilhão de dólares. (USDA, 2015; DARGATZ et al., 2016; JENNELLE et al., 2017).

A estirpe H5 de IAAP também atingiu a África Ocidental e Central. Em Camarões foi detectado, em 2016, um surto de IA, com prejuízos de 20 milhões de dólares. Na Nigéria foram reportados 750 focos da doença, com a morte de 3,5 milhões de aves. Burkina Faso, Costa do Marfim, Gana e Níger também relataram focos de H5N1. Outros países como Butão (H5N1), Áustria (H5N8), e Israel (H5N8) também relataram surtos em 2016 (FAO, 2016)

Os vírus do subtipo H5Nx asiático continuam causando surtos em diferentes partes do mundo, sendo os mais comumente relatados nos últimos anos. Em 2017,

a maioria dos surtos de IAAP ocorridos no mundo foi com o subtipo H5, sendo que as estirpes mais prevalentes foram H5N8, H5N1 e H5N6. Os surtos ocorreram em mais de 60 países de diversas regiões da Europa, Ásia, África, América do Norte e Central. No ano de 2018, houve uma diminuição no número de relatos da IAAP, com 3,19 milhões de casos reportados à OIE e 2,45 milhões de aves mortas e 15,26 milhões de aves abatidas e/ou sacrificadas. Os subtipos mais frequentes foram H5N6, H5N8 e H5N1. Os surtos ocorreram em mais de 30 países. Convém destacar que não houve notificações da doença nos EUA (OIE, 2018a).

Em 2019, foram notificados 924.185 casos de IAAP, com 645.025 aves mortas e 3,79 milhões de aves abatidas e/ou sacrificadas, sendo que os subtipos mais frequentes foram H5N8, H5N1 e H5N6, com surtos em 19 países.

Em 2020, foram notificados surtos de IAAP na Bulgária (H5N8), China (H5N1 e H5N6), Taiwan (H5N2, H5N5 e H5), República Checa, Alemanha e Hungria (H5N8), Índia (H5N1), Iraque e Israel (H5N8), Cazaquistão (H5), Nigéria (H5N6, H5N1 e H5N8), Filipinas (H5N6), Polônia e Romênia (H5N8), Rússia (H5 e H5N8), Arábia Saudita, Eslováquia e África do Sul (H5N8), Ucrânia (H5), Vietnã (H5N6 e H5N1) (OIE, 2020a).

Os vírus do subtipo H7 também têm causado muitos prejuízos à avicultura industrial. Em 1997, ocorreram surtos na Austrália (H7N4); de 1999 a 2000, os surtos de H7N1 atingiram a região de Veneza e Lombardia, afetando 413 propriedades, 8,1 milhões de aves de postura, 2,7 milhões de perus; 2,4 milhões de matrizes de corte e frangos; 247.000 galinhas d'angola; 260.000 codornas, patos e faisões; 1.737 aves de subsistência e 387 avestruzes (CAPUA; MARANGON; CANCELLOTTI, 2003).

Em 2002, um surto de H7N3 atingiu o Chile, na região de Valparaíso, com 617.800 matrizes de corte afetadas e 18.500 reprodutoras de perus (SWAYNE, 2008).

No período de 2003 a 2013, ocorreram surtos na Holanda, Bélgica e Alemanha (2003), Canadá, EUA e África do Sul (2004), Coreia do Norte (2005), Canadá (2007), Inglaterra (2008), Espanha (2009), África do Sul (2011-2013), Tailândia (2012-2013), Austrália (2012), Itália e Austrália (2013). No México, uma epidemia de H7N3, ocorreu de 2012 até o momento, atingindo mais de 18 milhões de aves (LEE; CRIADO; SWAYNE, 2020).

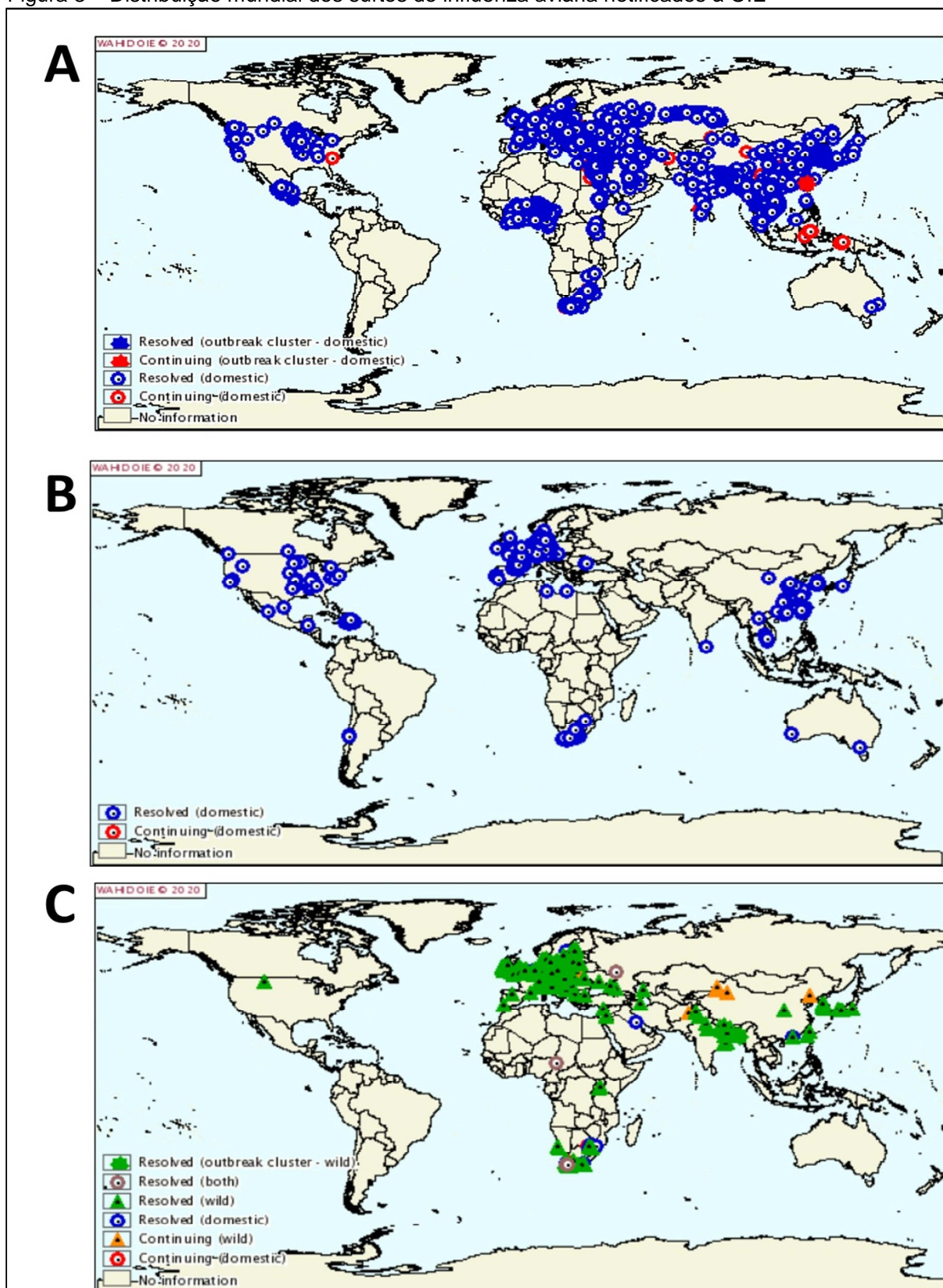
Em 2016, foi reportado um surto de H7N8 em aves domésticas, que ocorreu no estado de Indiana (SWAYNE; HILL; CLIFFORD, 2017). Nos Estados Unidos, foram relatados dois surtos de H7N9, em Lincoln, no estado do Tennessee, com 1.044 aves mortas e 127.956 sacrificadas (OIE, 2017b). Surtos na Argélia (H7N1) foram reportados também em 2016 (FAO, 2016). Surtos de IAAP com os subtipos H7 também ocorreram em países da Ásia, África, Europa e no continente Americano neste período.

No período de 2016 a 2019, foi descrito um surto de IAAP na província de Guangdong (China). Desde janeiro de 2017, um vírus H7N9 foi reportado em galinhas, perus e amostras ambientais. O vírus H7N9 também foi isolado em humanos, sendo por 1568 casos confirmados da doença e 616 mortes, no período de fevereiro de 2013 a dezembro de 2019 (FAO, 2019). O IAAP foi derivado de um vírus IABP circulante em mercados livres de aves desde março de 2013 (QI et al., 2018). Um surto de IABP subtipo H7 foi relatado no Chile em um plantel de perus, em agosto de 2019, com 13 mil perus afetados, em um lote de 67,5 mil aves, que foi submetido ao abate sanitário e eliminado em sua totalidade. Os dados de sequenciamento demonstraram que o vírus responsável pelo surto sofreu rearranjo de genes identificados em vírus isolados de aves silvestres entre 2013 e 2017 (JIMENEZ-BLUHM et al., 2019; OIE, 2019a).

Em 2020, foram notificados surtos de IAAP na Austrália (H7N7), México (H7N3) e também nos EUA (H7N3). Foi a primeira ocorrência de IAAP nos EUA desde 2017 (OIE, 2020a). Este surto (Abril a Agosto), causado por um vírus de IAAP do subtipo H7N3 relacionado aos vírus de aves silvestres, ocorreu em uma criação comercial de perus, localizada no condado de Chesterfield, na Carolina do Sul.

A Figura 3 mostra a distribuição mundial de surtos de IAAP, IABP em aves comerciais e IAAP em aves silvestres que foram notificados à OIE.

Figura 3 – Distribuição mundial dos surtos de influenza aviária notificados à OIE



Fonte: Adaptado de OIE (2020d).

Legenda: A) IAAP no período de 2005 a 2020; B) IABP em aves comerciais no período de 2006 a 2020; C) IAAP em aves silvestres período de 2017 a 2020; os focos solucionados estão destacados em azul e os focos atuais em vermelho.

MOTA et al. (2013) realizaram uma investigação para avaliar os padrões de circulação de IA em granjas comerciais de frangos de corte, entre 2004 e 2005. Não se obteve isolamento viral para IA, porém foi identificado um conglomerado epidemiológico, composto de 24 municípios, no estado de Rondônia, que apresentou resultados sorológicos positivos para IA, através da técnica de ELISA. Houve uma detecção de anticorpos contra o vírus de IA de 4,92% (5.230/ 106.126) na técnica de ELISA. Estas amostras foram submetidas à prova de IDGA para IA sendo que não ocorreu positividade em nenhum lote.

No período de 2015 e 2016, foi realizado um estudo de avaliação de circulação de VIA e VDNC em plantéis avícolas industriais, coordenado pelo Departamento de Saúde Animal (DSA), vinculado à Secretaria de Defesa Agropecuária (DSA) do MAPA. Foram realizadas coletas em 2.866 granjas (de frangos e perus de corte, galinhas poedeiras, avozeiros, matrizeiros e bisavozeiros, além de estabelecimentos de produção de anseriformes, avestruzes, codornas e outras espécies), provenientes de todas as regiões do país. Em cada propriedade foram obtidas amostras de 10-15 aves (soro sanguíneo, suabe de traqueia e suabe de cloaca). Foram analisadas 30.658 amostras, sendo submetidas à prova de ELISA para detecção de anticorpos contra o vírus da influenza aviária, com um percentual de positividade de 0,14% (44/30.658), conforme mostra a Figura 4. Não houve detecção de nenhuma amostra positiva na reação de RRT-PCR para detecção do gene M do VIA (MAPA, 2016).

Figura 4 – Municípios com pelo menos uma ave soropositiva no teste de ELISA para detecção de anticorpos contra o VIA, no estudo de avaliação da circulação dos VIA e VDNC, realizado pelo MAPA



Fonte: MAPA (2016).

No Brasil alguns estudos detectaram ou isolaram o vírus da IA e títulos de anticorpos contra o vírus de IA em aves migratórias, silvestres e de subsistência. O monitoramento de aves silvestres migratórias e aves de subsistência próximas aos sítios de invernada foram realizados (MOTA et al., 2013; REISCHAK, 2016).

Foram investigadas populações de aves silvestres, em sítios de invernada localizados nos estados de Amapá, Pernambuco, Rio Grande do Norte e Rio Grande do Sul e os criatórios de aves de subsistência, localizados no raio de 10 km ao redor destes sítios de invernada. Houve isolamento de IABP, com caracterização sorológica H3 em quatro amostras de aves silvestres, pertencentes à ordem *Charadriiforme*, nos estados de Pará e Pernambuco. Em aves de subsistência, foram avaliadas 3.705 propriedades, em 118 municípios, pertencentes a 12 estados, totalizando-se 2.865 aves. Cinco amostras foram positivas no isolamento viral de IABP, com caracterização sorológica H2, H3 e H4, nos estados do Pará, Pernambuco e Rio Grande do Sul (MOTA et al., 2013).

Em um estudo conduzido no Parque Nacional da Lagoa do Peixe (RS), foram coletadas 1212 amostras de suabes orofaríngeos e cloacais de aves migratórias, no

período de 2009 a 2012. Houve a detecção do VIA em 3,96% (48/1.212) e partir do sequenciamento foram identificados os subtipos H2N2 (1), H6Nx(1), H6N1(8), H9N2 (1) e H12N5(1). As análises filogenéticas demonstraram os vírus detectados foram semelhantes a vírus circulante na América do Sul (ARAUJO et al., 2018)

Uma pesquisa foi realizada com filhotes de papagaio-da-cara-roxa (*Amazona brasiliensis*), na região da Ilha Rasa (RJ), com a finalidade de determinar a prevalência de IA e DNC. Não houve detecção de VIA e VDNC nas 50 amostras de suabes orofaríngeo e cloacal, submetidas à detecção molecular, através da técnica de RRT-PCR (VAZ et al., 2017).

DE ARAUJO et al. (2014) analisaram 556 aves, de 23 diferentes espécies, representando 14 diferentes famílias da ordem *Charadriiformes*, sendo em sua maioria, aves migratórias, na região da Amazônia. O VIA foi detectado e identificado como H11N9, em 4 aves, da espécie *Arenaria interpres*, na Ilha de Canelas (Pará), em novembro de 2008.

Em um monitoramento realizado em aves de subsistência criadas no entorno de sítios de aves migratórias do Brasil, no período de 2011 a 2015, foram analisadas amostras de suabes de cloaca e de traqueia de 2.816 aves, submetidas à técnica de RRT-PCR para Influenza A. Apenas três suabes de traqueia foram positivos, porém não foram positivos para os subtipos H5 ou H7. No isolamento viral, não houve detecção de qualquer agente hemaglutinante. Para as amostras de soro, foi utilizado um kit comercial de ELISA competitivo, capaz de detectar anticorpos contra a nucleoproteína (NP) do VIA em amostras de qualquer espécie animal. Nesta prova de triagem, foi detectada a presença de anticorpos em 3,58% (101/2.816) das amostras avaliadas. Porém, na pesquisa de anticorpos pela prova de inibição de hemaglutinação, não houve a detecção de anticorpos contra os subtipos H5 e H7, que são de notificação obrigatória (REISCHAK, 2016).

2.1.8 Controle e monitoramento

Como o vírus de Influenza aviária é exótico no Brasil, as medidas de controle consistem em impedir a entrada e difusão do vírus no país, associadas às medidas de biossegurança, além da realização de inquéritos epidemiológicos oficiais para o monitoramento dos plantéis avícolas e de aves migratórias e de subsistência (BRASIL, 1994; 2002). As medidas de biossegurança são adotadas com a

finalidade de reduzir o risco de introdução e disseminação do agente, segundo três princípios: segregação: criação e manutenção de barreiras para limitar o trânsito de animais infectados ou materiais contaminados (saída do foco ou entrada em locais não infectados), prevenindo a infecção; limpeza de materiais (veículos, equipamentos) e desinfecção apropriada. Outras medidas para controle incluem a eliminação em massa dos animais, de forma humanitária e vacinação (em alguns casos) (FAO, 2008). A vacinação contra influenza aviária é proibida no País, pois pode afetar a vigilância epidemiológica. Em alguns países, a vacinação pode ser utilizada em conjunto com outras medidas de controle da doença, associadas à vigilância epidemiológica, com a finalidade de diminuir a suscetibilidade do hospedeiro ao vírus (MARANGON et al., 2004).

Em caso de ocorrência de focos de IA no país, o MAPA determina a erradicação do vírus, com a interdição da propriedade e a destruição das aves infectadas. Em abril de 2020, O MAPA definiu oito categorias para definição de um “caso” (MAPA, 2020c):

1) Caso suspeito de síndrome respiratória e nervosa (SRN) com aves apresentando sinais clínicos respiratórios, neurológicos ou digestivos acentuados, com queda súbita e significativa na produção de ovos (pelo menos 10%) ou ainda, aumento no número de ovos com má formação ou com defeitos na casca e aumento nas taxas de mortalidade de aves (maior ou igual a 10% em 72 horas, maior ou igual a 15% em aves comerciais de corte, com alojamento total de até 50 dias ou maior ou igual a 20% em aves comerciais de corte, com alojamento total superior a 50 dias), ou ainda, resultado positivo em testes sorológicos de vigilância ativa ou certificação (realizados em laboratórios credenciados) ou resultado positivo de ensaio laboratorial em amostras colhidas durante qualquer atividade de pesquisa não oficial;

2) Caso provável de SRN: casos suspeitos por aumento da taxa de mortalidade (como descrito no item 1), associados ou não a sinais clínicos ou lesões, e sem comprovação da ocorrência de agravo não infeccioso (falta de energia, falhas de equipamentos, intempéries, danos em instalações entre outros), presença de significativo número de aves com sinais neurológicos, resultado positivo em testes de detecção ao agente em laboratórios credenciados ou vínculo epidemiológico ou indícios de provável exposição ao agente, conforme avaliação do serviço veterinário oficial (SVO).

3) Caso confirmado/Foco de IAAP: isolamento e identificação do agente ou detecção do RNA viral específicos do VIA do tipo A, subtipos H5 ou H7 ou outro subtipo caracterizado como de alta patogenicidade, por IPIV ou sequenciamento genético em aves domésticas;

4) Caso confirmado/Foco de IAAP: isolamento e identificação do agente ou detecção do RNA viral específico do VIA do tipo A, subtipos H5 ou H7 caracterizado como de baixa patogenicidade, por IPIV ou sequenciamento genético, em aves domésticas;

5) Caso Confirmado/Foco de Influenza tipo A de alta patogenicidade: isolamento e identificação ou detecção do RNA viral específico do VIA tipo A que seja caracterizado como de alta patogenicidade, por IPIV ou sequenciamento genético, em aves não domésticas;

6) Caso Confirmado/Foco de Influenza tipo A de baixa patogenicidade: isolamento e identificação do agente ou detecção do RNA viral específico do VIA tipo A que não seja caracterizado como de alta patogenicidade, por IPIV ou sequenciamento genético, em aves não domésticas; ou dos subtipos (H1-4, H6 e H8-16 que não seja caracterizado como de alta patogenicidade), por IPIV ou sequenciamento genético, em aves domésticas;

7) Suspeita descartada: caso suspeito notificado ao SVO que não foi classificado pelo médico veterinário oficial como caso provável de SRN.

8) Caso Descartado de IAAP ou IABP: caso provável investigado pelo SVO, com resultados que não se enquadram nos critérios de definição de caso confirmado de IAAP ou IABP.

Os órgãos de vigilância oficiais devem ser notificados em qualquer uma das condições supracitadas, a fim de realizar a coleta do material dos lotes suspeitos e enviar para o LFDA, para a confirmação do diagnóstico VIA (SDA-MAPA, 2014).

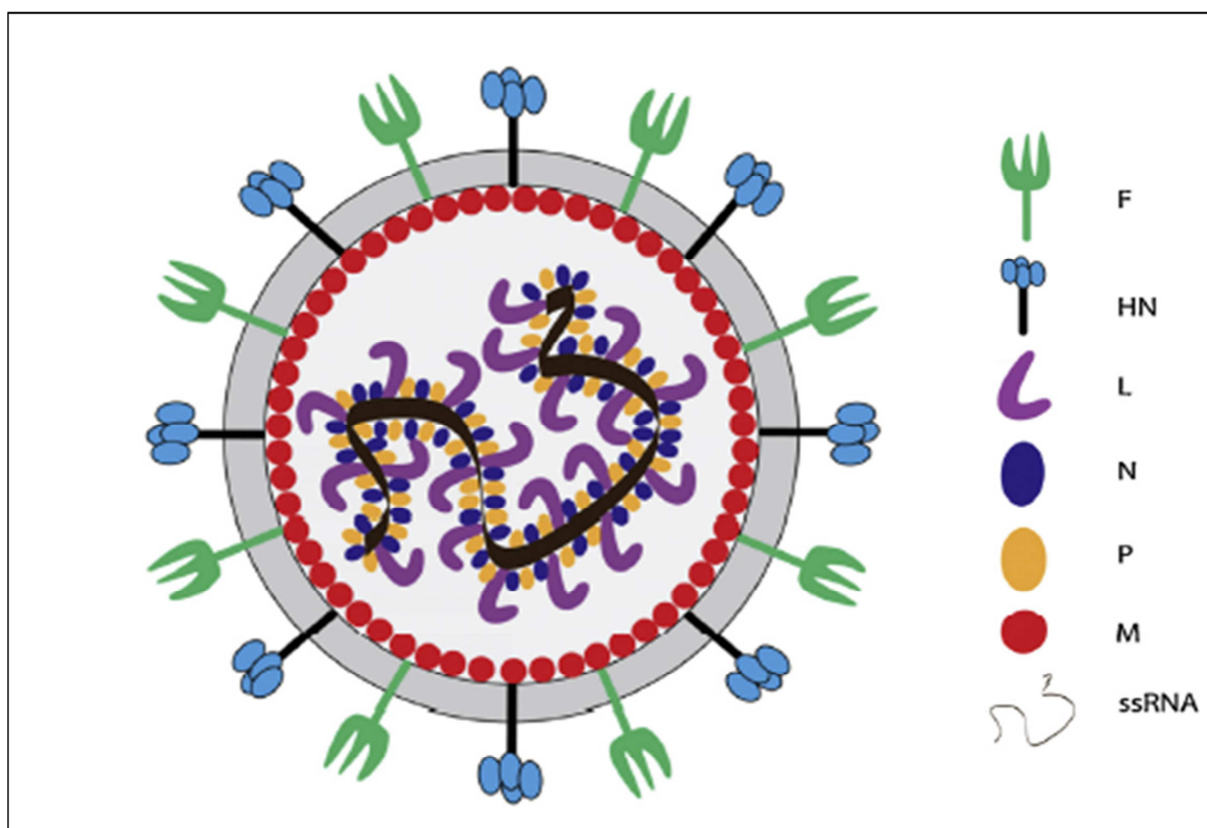
A adoção de ações de vigilância sanitária associadas ao diagnóstico laboratorial rápido e preciso são primordiais para realizar o monitoramento de Influenza aviária nas criações de aves comerciais e de subsistência, de modo a controlar possíveis surtos desta enfermidade no Brasil.

2.2 DOENÇA DE NEWCASTLE

2.2.1 Etiologia

O vírus da Doença de Newcastle (VDNC), também denominado como paramyxovírus aviário 1 (APMV-1), pertence à espécie *Avian orthavulavirus 1* (AOvV-1), gênero *Orthoavulavirus*, subfamília *Avulavirinae*, família *Paramyxoviridae*, (AMARASINGHE et al., 2019; ICTV, 2019). É um vírus pleomórfico e envelopado, com cerca de 200-300 nm. O genoma é composto por um RNA de fita simples, não segmentado, com polaridade negativa e tamanho aproximado de 15,2 Kb, que codifica pelo menos 6 proteínas estruturais: nucleoproteína (NP), matriz (M), fosfoproteína (P), proteína de fusão (F), hemaglutinina-neuraminidase (HN), RNA polimerase (L) (ALEXANDER, 1998; ALEXANDER, 2000; LAMB; PARKS, 2007; GANAR et al., 2014), conforme a esquematizado na Figura 5.

Figura 5 – Representação esquemática do VDNC



Fonte: Adaptado de Ganar (2014).

Legenda: F – proteína de fusão, HN – proteína hemaglutinina-neuraminidase; L – RNA polimerase; N – nucleoproteína; P – fosfoproteína; M – proteína de matriz; ssRNA – RNA de fita simples.

A nomenclatura VDNC é reservada exclusivamente para a doença que resulta na infecção por estirpes de APMV-1 que são patogênicas para aves domésticas. A DNC faz parte da lista das enfermidades infecciosas de notificação imediata da OIE, sendo seus focos de notificação compulsória. A definição atual adotada pela OIE permite a classificação da patogenicidade dos isolados pelo teste *in vivo*, teste de patogenicidade intracerebral (ICPI), e pelo sequenciamento gênico do sítio de clivagem da proteína F0. Isolados virais que apresentam valores de ICPI maiores ou iguais a 0,7 ou que possuam múltiplos aminoácidos básicos (ao menos 3 argininas ou lisinas) entre as posições 113 a 116 na porção C-terminal C da proteína F2 e de fenilalanina no resíduo 117 da porção N-terminal da proteína F1 são classificados como velogênicos e devem ser notificados à OIE (OIE, 2012a).

Devido ao importante papel desempenhado pelo sítio de clivagem na determinação da patogenicidade, o gene F é alvo mais importante na diferenciação das estirpes do VDNC (COLLINS; STRONG; ALEXANDER, 1996). A sequência -¹¹³R/K-Q-K/R-R/K*F¹¹⁷ é encontrada nas estirpes velogênicas de VDNC. É responsável por aumentar a virulência do VDNC, uma vez que a clivagem da proteína F será reconhecida por proteases do tipo furina, que é localizada em diversos tecidos, incluindo no sistema neurológico. Com isso, o vírus consegue realizar uma replicação sistêmica nos tecidos das aves infectadas. No caso de ocorrência das estirpes lentogênicas, o sítio de clivagem apresenta no máximo dois aminoácidos básicos nos resíduos entre as posições 113 e 116, além de leucina no resíduo 117 na porção N-terminal da proteína F1 (¹¹³K/R-Q-G-R/K*L¹¹⁷), que é reconhecida apenas pelas proteases do tipo tripsina, que são encontradas em tecidos epiteliais principalmente do trato respiratório e digestório e com isso estes vírus possuem replicação limitada nestes locais.

DNC é uma das mais importantes enfermidades que acometem as aves, sendo considerada como sendo uma das mais devastadoras doenças de galinhas e outras aves domésticas. As perdas causadas por surtos desta enfermidade têm sido significativas resultando na eliminação de milhares de aves em diversos países e restrições nas importações/exportações. Os prejuízos e danos não se limitam apenas às aves infectadas com mortalidade do lote, mas também pelo impacto econômico negativo com a restrição do comércio de animais e subprodutos, além de embargos de áreas e países com focos da doença. Tal enfermidade tem sido, e é até hoje, um dos problemas sanitários mais importantes da avicultura industrial, em

face dos elevados prejuízos que ocasiona (LESLIE, 2000; ALDOUS; ALEXANDER, 2001; KHATUN et al., 2018).

2.2.2 Diversidade Viral

Apesar de todos os isolados do VDNC pertencerem a um mesmo sorotipo, a ampla circulação do VDNC em populações de aves domésticas levou a uma significativa diversidade genética do vírus e o surgimento de variantes virais. Baseado na filogenia, o VDNC pode ser dividido em duas classes (I e II) (CZEGLEDI et al., 2006). Devido à ampla circulação mundial e a constante evolução do VDNC, um consórcio internacional de especialistas foi formado para realizar profundas análises da diversidade genética do VDNC, gerando dados das classes I e II do gene da proteína de fusão (F) (DIMITROV et al., 2019)

A circulação dos vírus da classe I, principalmente em aves silvestres, que não são vacinadas contra DNC, pode explicar a baixa diversidade genética desses vírus, que também são de baixa virulência. Os vírus da classe II são geneticamente e fenotipicamente mais diversos e frequentemente isolados de aves domésticas, exibindo uma maior virulência (DIMITROV et al., 2016). Existem 20 genótipos da classe II (nomeados de I a XXI, porém não há nenhum vírus incluído no genótipo XV) (DIMITROV et al., 2019).

2.2.3 Hospedeiros

Mais de 250 espécies de aves são suscetíveis à infecção natural ou experimental com o VDNC, incluindo as aves domésticas, aves migratórias e aquáticas. Porém a severidade da doença varia conforme o hospedeiro e a virulência da estirpe viral, a idade e imunidade das aves, ocasionando diversas manifestações da doença: quadros graves, brandos ou assintomáticos. DNC é uma enfermidade altamente severa nas aves suscetíveis, com taxas de mortalidade maiores que 50% em lotes de frangos de corte (MILLER; KOCH, 2013).

A ocorrência da DNC em *Columbiformes* já foi descrita em muitas partes do mundo, incluindo a América do Sul. Os pombos podem ser considerados como uma potencial fonte de infecção do VDNC em lotes de aves comerciais, desde que haja uma adaptação prévia (KOMMERS et al., 2001; FERREIRA et al., 2019). Os vírus

que causam doenças em pombos são pertencentes ao genótipo VI, também conhecido como Pigeon Paramixovírus – sorotipo 1 (PPMV-1). Este genótipo é endêmico nas populações de aves columbiformes, mas também ser detectado em aves domésticas e outras espécies de aves silvestres (ZANETTI et al., 2001; KOMMERS et al., 2002; ALEXANDER, 2011).

Além das aves, o VDNC pode infectar mamíferos e possui potencial zoonótico, podendo ocasionar conjuntivite (uni ou bilateral), quadros de calafrios, dores de cabeça, febre, e até pneumonia em humanos (CAPUA; ALEXANDER, 2004; OIE, 2012a; MILLER; KOCH, 2013).

2.2.4 Sinais clínicos e lesões

As estirpes do VDNC têm sido agrupadas em cinco patotipos, baseados nos sinais clínicos observados em aves infectadas (ALEXANDER; SENNE, 2008; OIE, 2012b):

1. **velogênico viscerotrópico:** forma altamente patogênica, com lesões intestinais e respiratórias hemorrágicas, depressão, inapetência, queda substancial na produção de ovos, respiração ofegante, diarreia profusa e amarelo-esverdeada, que leva rapidamente a desidratação, cabeça inchada e cianose de crista. A mortalidade pode chegar a 90% e as aves infectadas morrem dentro de um ou dois dias. As aves que sobreviverem à fase inicial desenvolvem sintomas nervosos;
2. **velogênico neurotrópico:** sintomas respiratórios e nervosos agudos são predominantes, com depressão súbita, inapetência, queda na produção de ovos, além de tosse e outros sinais respiratórios, seguidos por sinais nervosos em poucos dias. A mortalidade geralmente é de 10-20% em aves adultas, podendo ser maior em aves jovens.
3. **mesogênico:** as aves apresentam principalmente tosse e outros sintomas respiratórios. Outros sintomas incluem depressão, perda de peso e diminuição da produção de ovos por até três semanas. Sintomas nervosos podem se desenvolver tardiamente. A mortalidade é de cerca de 10% (aves jovens são mais susceptíveis que as adultas);

4. lentogênico: forma com infecção respiratória branda ou subclínica; pode ser observada uma pequena queda na produção de ovos. Sem sinais nervosos e a mortalidade é geralmente insignificante.
5. assintomático: forma que consiste em uma infecção entérica subclínica.

Os sinais observados dependem se o vírus possui predileção pelos sistemas respiratório, digestivo ou nervoso:

- sinais respiratórios consistem de tosse, espirros, estertores, descarga nasal, dispneia, respiração ofegante, inchaço de cabeça e pescoço;
- sinais nervosos incluem prostração, tremores, paralisia de asas e pernas, opstótono, espasmos e paralisia, incoordenação, ataxia e torcicolos;
- sinais entéricos: diarreia esverdeada e aquosa ou sanguinolenta;

Em aves de postura ocorre uma acentuada queda de postura e piora na qualidade dos ovos produzidos (defeitos e alteração na cor, formato e consistência do albúmen). Outros sinais clínicos incluem variados graus de depressão e inapetência, conjuntivite, rinite. A taxa de mortalidade é variável cerca de 50% ou maior em aves jovens, podendo chegar a 100% no caso de uma infecção com uma estirpe de velogênica viscerotrópica do VDNC (MILLER; KOCH, 2013; MILLER, 2014).

As lesões são disseminadas e abrangem edema de cabeça, região do pescoço, hemorragias e ulcerações na laringe, no coração, tonsilas cecais, baço, petéquias na mucosa do proventrículo e no intestino, turvação dos sacos aéreos, traqueíte, peritonite e esplenomegalia (PAULILLO; DORETTO JÚNIOR, 2009; MILLER; KOCH, 2013).

2.2.5 Transmissão

A transmissão horizontal do vírus ocorre por forma direta, entre as aves infectadas e aves suscetíveis, ou indireta pelo contato com água, alimento, fômites contaminados com partículas virais, ou ainda, pela inalação de aerossóis na cama, penas, produtos, cama de aviário e carcaças contaminadas com vírus. Existem algumas diferenças de acordo com a estirpe viral envolvida (MILLER; KOCH, 2013). Alguns estudos mostram que aves infectadas experimentalmente com vírus de origem de aves domésticas conseguem transmitir o vírus, mesmo com uma carga viral muito baixa. Enquanto outros genótipos de VDNC, que circulam

endemicamente em aves silvestres, infectam aves domésticas apenas em doses mais altas e não conseguem ser transmitidos para as aves suscetíveis (DIMITROV et al., 2019; FERREIRA et al., 2019).

O período de incubação varia de 2 a 15 dias em aves domésticas, sendo influenciada por diversos fatores: via de infecção, dose infectante, patogenicidade do vírus, além da idade e espécies das afetadas. A possibilidade de transmissão vertical do VDNC e o real significado desta via na epizootia da DNC não estão totalmente esclarecidos. A transmissão do vírus também pode ocorrer por vetores, tais como equipamentos, roupas, calçados, ração, água, vacinas e produtos avícolas contaminados pelo VDNC (MILLER; KOCH, 2013).

2.2.6 Diagnóstico

Assim como foi descrito para influenza aviária, o diagnóstico clínico desta doença é extremamente difícil por não haver lesão patognomônica. A confirmação da presença do vírus pode ser feita pelo isolamento viral e provas moleculares, para detecção do ácido nucleico do VDNC. A confirmação da infecção é realizada através do isolamento viral em ovos embrionados, que é o teste de referência ou “gold standard” (OIE, 2012b).

Atualmente, testes moleculares são reconhecidos pela OIE por proverem resultados rápidos e eficientes, como RT-PCR e RRT-PCR (OIE, 2012b). A principal vantagem deste teste é a eliminação da etapa de processamento após a amplificação, que reduz a contaminação cruzada de amostras (WISE et al., 2004; ALEXANDER; SENNE, 2008). A técnica de RRT-PCR foi desenvolvida e validada durante um surto de DNC velogênico nos Estados Unidos em 2002-2003 (KINDE et al., 2003) e substituiu o isolamento viral como principal teste de diagnóstico de DNC. Assim, a técnica de RRT-PCR para detecção do gene M dos APMV-1 é amplamente utilizada como triagem de amostras para detectar qualquer APMV-1 em 48 laboratórios nos Estados Unidos e diversos países da União Europeia (WISE et al., 2004). Além deste teste, outros foram também desenvolvidos para a detecção dos APMV-1 tendo os genes da polimerase (L) e da nucleoproteína (N) como alvos (FULLER et al., 2010; FERREIRA, H.L.; SUAREZ, 2019). A técnica de RRT-PCR também foi padronizada em outros estudos para diferenciar as estirpes virulentas

das não virulentas do VDNC (WISE et al., 2004; PHAM et al., 2005; FARKAS et al., 2009; NIDZWORSKI; RABALSKI; GROMADZKA, 2011).

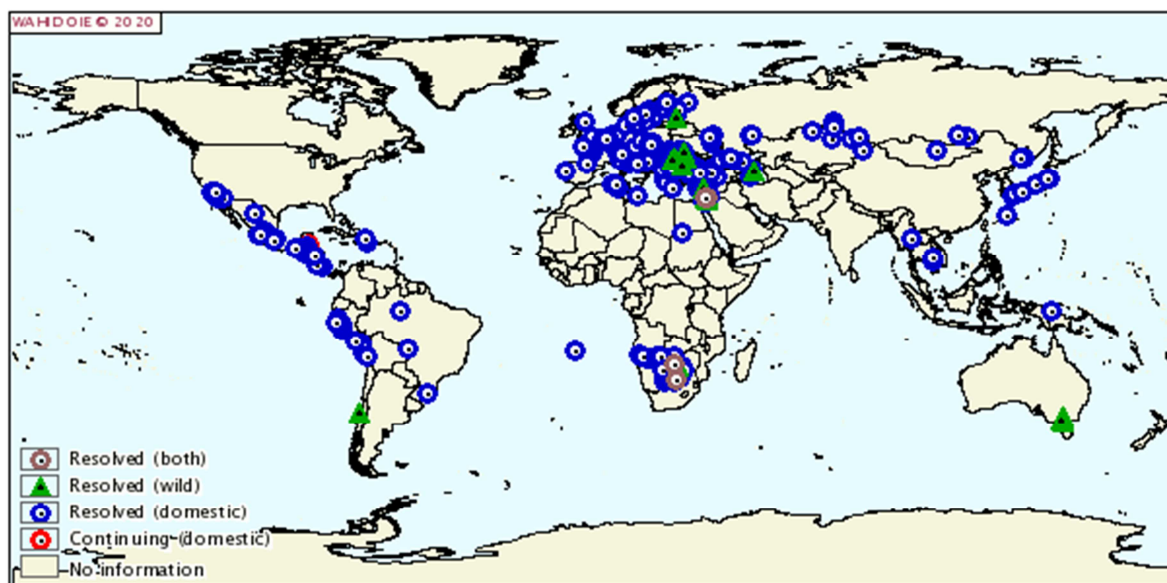
O desempenho da técnica de PCR pode ser influenciado pelo tipo de matriz utilizada para a extração de RNA (fezes ou tecidos ricos em proteínas, por exemplo), podendo gerar resultados falso-negativos (YI; LIU, 2011).

Provas sorológicas, tais como inibição de hemaglutinação (HI) e o ensaio imunoenzimático ELISA, no formato indireto, competitivo ou de bloqueio em fase líquida, são utilizadas para detecção de anticorpos (DE SOUSA; MONTASSIER; PINTO, 2000; OLIVEIRA et al., 2013). No teste de HI pode ocorrer um nível de reatividade cruzada entre os vários sorotipos de paramixovírus aviários. Como os VDNC são classificados como um único sorotipo, um painel de soros de referência ou anticorpos monoclonais (MAbs) específicos para o APMV-1 pode ser utilizado para diferenciar algumas estirpes virais (OIE, 2012b). O teste de ELISA também é utilizado amplamente para verificar a eficiência da resposta imune humoral desencadeada pela utilização de vacinas (HÄUSLAIGNER et al., 2009), incluindo alguns testes para detectar anticorpos após a utilização de vacinas recombinantes.

2.2.7 Estudos anteriores e cenário atual

A DNC foi descrita pela primeira vez em Java (Indonésia), em 1926 e, no ano seguinte em Newcastle, condado de Tyne (Inglaterra). Com o advento da avicultura industrial, surtos foram identificados em várias partes do mundo (MILLER; KOCH, 2013; ABDISA; TAGESU, 2017). A Figura 6 mostra a distribuição mundial de surtos de DNC que foram notificados à OIE, no período de 2005 a 2020.

Figura 6 – Distribuição mundial dos surtos de DNC notificados à OIE, no período de 01/2005 a 03/2020



Fonte: Adaptado de OIE (2020f).

Legenda: Os focos solucionados estão destacados em azul, focos atuais em vermelho, focos em aves silvestres (verde), focos solucionados (aves domésticas e silvestres) em cinza.

A DNC foi identificada no Brasil em 1953 no estado do Pará a Amapá e foi introduzida nestas localidades a partir da importação de carcaças contaminadas dos Estados Unidos (PAULILLO; DORETTO JÚNIOR, 2009). Diversos surtos da doença foram relatados na década de 70 e o vírus foi recentemente caracterizado com pertencente ao sub-genótipo V.1 (FERNANDES et al., 2014), que continuou circulando até a década de 90 (ALDOUS et al., 2003). A última detecção em aves domésticas de subsistência ocorreu, em 2006, em três estados: Rio Grande do Sul (Vale Real), Amazonas (Manaus) e Mato Grosso (Lambari d'oeste) (PAULILLO; DORETTO JÚNIOR, 2009; OIE, 2020b) – Figura 7.

Figura 7 - Últimos surtos de DNC ocorridos no Brasil



Fonte: Google Maps, adaptado por Luciano (2020).

Legenda: as áreas delimitadas em vermelho indicam os estados brasileiros onde foram reportados os últimos surtos de DNC.

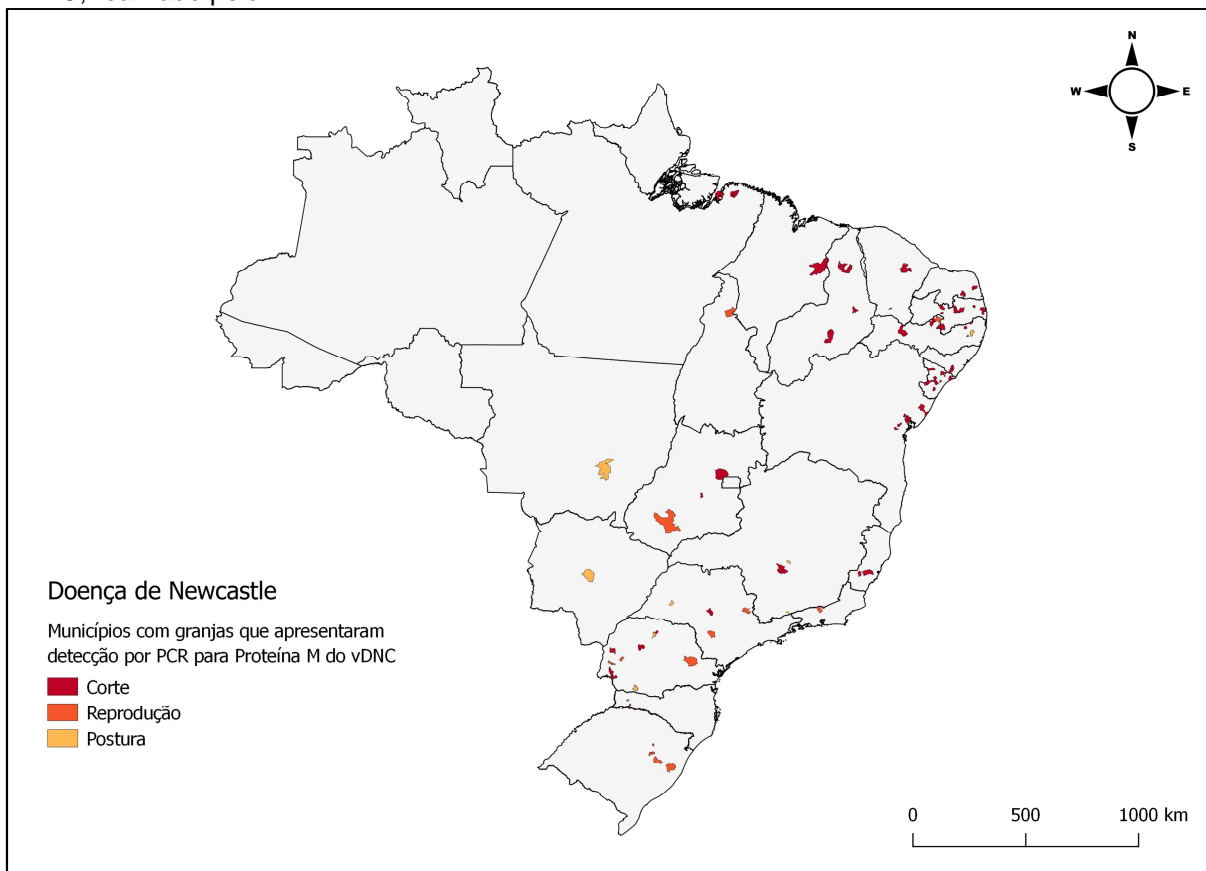
ORSI et al. (2010b) detectaram reações soropositivas contra o VDNC em 39,1% (619/1.583) dos lotes de frangos de corte, submetidos à reação de ELISA. Setenta e sete amostra foram positivas no isolamento viral, correspondendo a 4,9% do total de lotes avaliados. Todos os vírus isolados foram classificados como lentogênicos. Em outro estudo conduzido pelos mesmos autores, foram analisadas 81.825 amostras de soro sanguíneo provenientes de 5.455 lotes de frangos de corte, em nove estados brasileiros, no período de 2003 a 2005. Houve detecção de títulos contra o VDNC, pela técnica de ELISA, em 28,8% dos lotes analisados e 15 amostras positivas no isolamento viral, classificados como não-patogênicos (ORSI, et al., 2010a).

No estudo de avaliação de circulação de VIA e VDNC em plantéis avícolas industriais, realizado pelo MAPA, no período de 2015 e 2016, foram amostradas 2.866 granjas (de frangos e perus de corte, galinhas poedeiras, avozeiros, matrizeiros e bisavozeiros, além de estabelecimentos de produção de anseriformes, avestruzes, codornas e outras espécies), provenientes de todas as regiões do país, sendo que 1145 praticavam a vacinação contra o VDNC. Em cada propriedade foram obtidas amostras de 10 a 15 aves (soro sanguíneo, suabe de traqueia e suabe de cloaca). Nas propriedades em que não houve a vacinação contra o VDNC, todas as amostras de soro sanguíneo foram submetidas à prova de ELISA. Houve um percentual de positividade de 2,7% das amostras analisadas (314/11.419), sendo que todas as amostras positivas foram provenientes de granjas de frangos e perus de corte, com uma maior reatividade nas regiões do norte e nordeste (15,4%), centro-oeste (1,9%) e sul e sudeste (2,4%). O percentual de positividade da prova de RRT-PCR (para detecção do gene da proteína M) foi de 4,6% (486/10563). As amostras positivas foram submetidas à prova de RRT-PCR para o gene da proteína de fusão, sendo que nenhuma amostra foi positiva, descartando a ocorrência de vírus patogênico da DNC nas amostras analisadas (Figura 8).

MARKS et al. (2014) pesquisaram a circulação de VDNC, em aves de subsistência localizadas próximas a sítios de aves migratórias no Brasil. Foram detectados níveis de anticorpos contra o VDNC em 33,8% das amostras de soro coletadas, e em 42 das 48 propriedades avaliadas, ao menos uma ave soropositiva foi encontrada. Não houve detecção molecular nas amostras de suabes de traqueia e cloaca, submetidas à técnica de RRT-PCR.

No Brasil, um surto da DNC foi descrito em pombos domésticos (*Columba livia*), provenientes de uma praça pública em Porto Alegre, que apresentaram sintomas neurológicos e mortalidade. A análise filogenética revelou que esta estirpe viral virulenta foi classificada na Classe II e no genótipo VI (SOUZA et al., 2018).

Figura 8 – Municípios com pelo menos uma ave, de criações comerciais, positiva ao teste de RRT-PCR para detecção do gene da proteína M do VDNC, no estudo de avaliação da circulação dos VIA e VDNC, realizado pelo MAPA



Fonte: MAPA (2016).

2.2.8 Controle e monitoramento

A ocorrência de um surto da DNC, além de causar elevadas perdas econômicas ao país, também acarreta um grande obstáculo à exportação de produtos avícolas para outros mercados consumidores, uma vez que programas profiláticos concernentes à DNC estão enquadrados nos sistemas de biossegurança, em nível mundial, sendo estabelecidas barreiras sanitárias para exportação e importação entre os países (LESLIE, 2000).

O controle da DNC é frequentemente realizado, em aves reprodutoras, frangos de corte e poedeiras comerciais, mediante a adoção de procedimentos de biossegurança (sacrifício das aves infectadas, limpeza, desinfecção e quarentena), associados com a administração de vacinas durante o alojamento das aves.

Existem diferentes tipos de vacinas contra o VDNC, como vacinas vivas atenuadas, vacinas inativadas e recombinantes (KAPCZYNSKI; KING, 2005; CORNAX; MILLER; AFONSO, 2012; FERREIRA, et al., 2020).

No Brasil, as aves reprodutoras e de postura comercial devem realizar a vacinação preventiva sistemática contra a DNC, à exceção das aves SPF (*Specific Pathogen Free*). Estabelecimentos avícolas que enviam aves para locais de aglomerações e que enviam aves e ovos férteis para estabelecimentos de venda de aves vivas são obrigados a vacinar para DNC as aves alojadas para este fim. Nos demais estabelecimentos avícolas, o uso da vacina tem caráter voluntário (MAPA, 2020d). Para a primeira vacinação podem ser utilizadas as estirpes B1 (cepa lentogênica), Ulster ou VG-GA (cepas enterotrópicas e avirulentas). A estirpe La Sota (lentogênica), por ser mais patogênica, deve ser utilizada na segunda vacinação (PAULILLO; DORETTO JÚNIOR, 2009). Tais medidas têm por finalidade evitar a disseminação do vírus e eliminar a infecção de uma região após um surto. Quando administradas em aves saudáveis, vacinas formuladas com VDNC de baixa virulência ou vacinas recombinantes são capazes de prevenir a doença clínica e a mortalidade, em casos de infecções com estirpes virulentas (DIMITROV et al., 2017b).

Há três objetivos para a utilização da vacinação como ferramenta de controle da DNC: diminuir ou eliminar a doença clínica; diminuir a transmissão viral e aumentar a dose infectante responsável pelo desafio viral (KAPCZYNSKI; AFONSO; MILLER, 2013). As estirpes de baixa virulência B1 e La Sota são comumente utilizadas como cepas vacinais em várias partes do mundo, conferindo proteção contra a DNC desde que administradas da maneira correta, estejam viáveis e que a resposta imune seja desenvolvida antes da exposição ao desafio viral (KAPCZYNSKI; KING, 2005; CORNAX; MILLER; AFONSO, 2012). A imunização incompleta ou inadequada geralmente resulta na doença e na morte de aves após a infecção pelo VDNC virulento. Outra causa da diminuição da eficácia da vacina é a existência de anticorpos (inclusive maternos) nas aves, que podem neutralizar a vacina e, assim, reduzir a eficácia das vacinas com ND (DIMITROV et al., 2017b).

As medidas de controle nem sempre são suficientes, pois a história tem demonstrado que, de tempos em tempos, amostras de VDNC emergem de fontes desconhecidas, existindo evidências de surtos da doença em aves domésticas e

isolamento do vírus patogênico de aves exóticas em algumas partes do mundo, devido à diminuição das práticas de controle sanitário (MILLER; KOCH, 2013).

Em caso de suspeita de um surto da DNC, os órgãos de vigilância oficiais devem ser notificados, com a finalidade de realizar a coleta do material dos lotes suspeitos e enviar para o Laboratório Federal de Defesa Agropecuária (LFDA), localizado em Campinas – SP, para a realização do diagnóstico confirmatório da enfermidade. O LFDA é um laboratório referência da OIE na América do Sul e, utiliza as metodologias internacionais para o diagnóstico do VDNC. O MAPA também autorizou o credenciamento de laboratórios estaduais para realização do diagnóstico de triagem do VIA, através da técnica de ELISA e moleculares (RRT-PCR para o gene M do VDNC) (SDA-MAPA, 2014).

A adoção de ações de vigilância sanitária associadas ao diagnóstico laboratorial rápido e preciso são primordiais para realizar o monitoramento da DNC nas criações de aves comerciais e de subsistência, de modo a controlar possíveis surtos desta enfermidade no Brasil.

2.3 LEGISLAÇÃO OFICIAL PARA CONTROLE DE IA E DNC (MAPA)

O MAPA, através da Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA), do Departamento de Saúde Animal e da Coordenação de Sanidade Avícola publicou diversos atos legislativos e normativos, visando estabelecer diretrizes para o controle da IA e da DNC no país.

A Instrução Normativa do Departamento de Saúde Animal (IN SDA) nº 32, de 13 de maio de 2002, aprovou as normas técnicas de vigilância para a DNC e IA, e de controle e erradicação para a DNC, obrigando o registro dos estabelecimentos avícolas de controle permanente e eventuais, sendo que os mesmos devem notificar imediatamente ao serviço oficial de defesa sanitária animal qualquer suspeita de ocorrência da DNC e de IA. Também foram estabelecidos os procedimentos de interdição da propriedade com suspeita; colheita e envio de amostras para o laboratório oficial ou credenciado e os tipos de exames a serem solicitados; medidas de desinfecção, de acordo com as recomendações da OIE; condução de inquérito epidemiológico; medidas a serem adotadas em caso de confirmação da suspeita: com sacrifício das aves do estabelecimento avícola e a destruição ou tratamento

apropriado dos resíduos (ração, cama, fezes e fômites contaminados); vazio sanitário; criação de zonas de proteção e de vigilância (BRASIL, 2002).

A Instrução Normativa do Departamento de Saúde Animal (IN SDA) nº 17, de 07 de abril de 2006 aprovou o Plano Nacional de Prevenção da Influenza aviária e de controle e prevenção da doença de Newcastle em todo o território brasileiro. A legislação prevê a promoção de ações direcionadas à defesa sanitária animal, visando o fortalecimento do sistema de atenção veterinária. Tais medidas incluem a realização de inquéritos epidemiológicos anuais, determinação dos requisitos sanitários para importação e exportação de aves vivas e material genético, produtos e subprodutos avícolas, estabelecimento de medidas de biossegurança para prevenção de IA e DNC nos estabelecimentos avícolas nacionais e os requisitos para o trânsito interestadual e aves e ovos férteis entre as unidades da federação (BRASIL, 2006).

O Ofício Circular DSA nº 7, de 24 de janeiro de 2007 estabeleceu os procedimentos permanentes de vigilância para IA e DNC a serem executados pelos serviços estaduais de defesa sanitária animal, trânsito interestadual de aves de descarte de granjas de reprodução e de granjas produtoras de ovos para consumo, proibição do trânsito interestadual de esterco, cama de aviário, resíduos de incubatórios e abatedouros que não forem submetidos a tratamentos capazes de eliminar a eventual presença dos agentes causadores de IA e DNC. Também foram estabelecidas ações a serem adotadas em relação às taxas de mortalidade observadas em lotes de aves de corte e aves de descarte (BRASIL, 2007b).

Em 2005, a Organização Mundial do Comércio (do inglês, *World Trade Organization*) reconheceu o Brasil como livre de DNC no segmento da avicultura industrial (WTO, 2005). A norma interna DSA nº 3, de 03 de outubro de 2011, declarou os plantéis avícolas industriais brasileiros como livres de DNC e IA notificáveis. Esta informação foi baseada nos resultados dos inquéritos epidemiológicos para avaliação da atividade viral dessas duas enfermidades em plantéis avícolas industriais e na vigilância ativa e passiva realizada até a data da publicação da referida norma (BRASIL, 2011).

Através do informativo PNSA nº 4, publicado em 27 de dezembro de 2012, houve o reconhecimento, pelo DSA, da existência de dois sítios de aves migratórias adicionais, localizados no estado do Mato Grosso: Praias do Rio Paraguai e Praias

do Rio Araguaia. Assim, o país passaria a ter um total de vinte sítios de aves migratórias reconhecidos pelo DSA e localizados em dez estados (BRASIL, 2012a).

A nota técnica CSA nº 16, de 08 de outubro de 2012 determinou quais são os procedimentos de vigilância epidemiológica para IA e DNC em sítios de aves migratórias, abrangendo a vigilância ativa para IA e DNC em aves domésticas residentes nestes locais (aves de subsistência e criações de galinhas, perus e codornas e anseriformes) e a vigilância passiva em aves migratórias e silvestres (BRASIL, 2012b).

O Plano de contingência para influenza aviária e doença de Newcastle (versão 1.4) contém os procedimentos de atenção a suspeitas e medidas de contenção de episódio de IA e DNC, na tentativa de prover um documento básico de referência sobre as ações a serem executadas pelo Serviço Veterinário Oficial (SVO), como medida de prevenir, controlar e impedir a disseminação dos agentes dessas doenças no plantel avícola nacional (BRASIL, 2013a).

A IN SDA nº 21, de 21 de outubro de 2014 estabeleceu as normas técnicas de certificação sanitária da compartimentação da cadeia produtiva avícola das granjas de reprodução, de corte e incubatórios, de galinhas ou perus, para a infecção por IA e DNC, com a finalidade de reconhecer e atestar subpopulação de aves com status sanitário diferenciado, por meio da adoção de procedimentos adicionais de biossegurança, vigilância epidemiológica, supervisões e auditorias (BRASIL, 2014).

IN SDA nº 11, de 06 de abril de 2020 estabeleceu alterações pontuais em instruções normativas SDA ou Anexos de Instruções normativas SDA, que regulamentam os programas nacionais de sanidade do MAPA, incluindo o PNSA, com a finalidade de assegurar a manutenção da saúde pública, a atividade econômica pecuária e o abastecimento de produtos de origem animal à população, no contexto da situação de disseminação do COVID-19 e sua classificação mundial como pandemia e emergência em saúde pública de importância internacional.

Em 2020, foram publicados documentos informativos, sob a forma de manuais: “Manual de colheita, armazenamento e encaminhamento de amostras” (MAPA, 2020b) e o “Manual de atendimento à notificação de suspeita de SRN em aves domésticas” (MAPA, 2020a), além de fichas técnicas de IA (MAPA, 2020c) e da DNC (MAPA, 2020d), contendo, respectivamente, informações sobre os procedimentos de colheita e envio de amostras para os laboratórios (tipo de suabes utilizados para a colheita de amostras, acondicionamento do material, meios de

transporte adequados, manutenção da cadeia de frio, limite de dias para o transporte e entrega das amostras no laboratório), como realizar o atendimento à notificação de suspeita de SRN em aves domésticas e as informações gerais sobre as duas enfermidades.

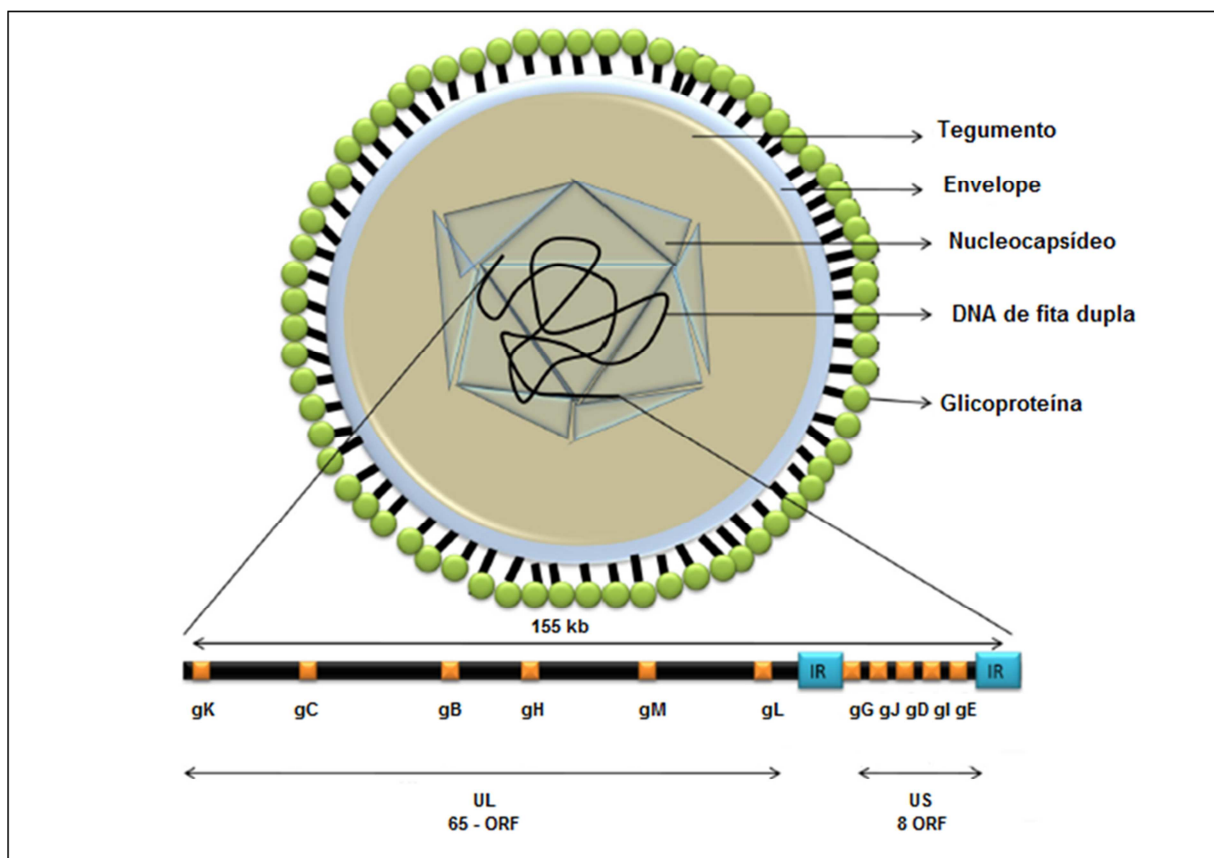
2.4 LARINGOTRAQUEÍTE INFECCIOSA DAS GALINHAS

2.4.1 Etiologia

O VLTI ou Gallid herpesvírus tipo 1, pertence a família Herpesviridae, subfamília Alphaherpesvirinae, gênero Iltovirus (DAVISON, 2010; ICTV, 2019). O vírus é composto por uma molécula de DNA de fita dupla, com aproximadamente 150-155Kb, um nucleocapsídeo icosaédrico e um envelope glicoproteico. O genoma de DNA é composto por duas regiões: longa única (UL – 113 kb) e curta única (US – 13 kb), sendo a região US flanqueada por sequências de repetições invertidas (IR e TR – 11kb). (Figura 9). O capsídeo possui o diâmetro de 80 a 100 nm de diâmetro e o tamanho da partícula viral varia de 200 a 350 nm (BAGUST; JONES; GUY, 2000; FUCHS et al., 2007; LEE et al., 2011).

O genoma do VLTI consiste de 80 *open reading frames* (ORFs), sendo que 65 estão localizadas na região UL e 9 na região US e 6 na região IR (LEE et al., 2011). O envelope contem glicoproteínas denominadas gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gJ, gK, gL e gM que são codificadas pelas ORFs altamente conservadas UL27, UL44, US6, US8, US4, UL22, US7, US5, UL53, UL1 e UL10, respectivamente (YORK, et al., 1990; PICCIRILLO et al., 2016). As glicoproteínas virais são importantes no processo de replicação do VLTI e estão relacionadas com a estimulação da resposta imune humoral e celular do hospedeiro (COPPO; HARTLEY; DEVLIN, 2013).

Figura 9 – Representação esquemática do VLT1



Fonte: Adaptado de Gowthaman (2020).

Legenda: UL – região longa; US – região curta; IR – sequências de repetições invertidas; ORF – *open reading frames*.

O gene UL-1 tem um importante papel na replicação viral, podendo estar associado à expressão gênica no hospedeiro ou com a clivagem e encapsidação do DNA viral (NADIMPALLI et al., 2017).

O mecanismo de replicação viral se inicia na mucosa traqueal e na conjuntiva (maiores sítios de replicação) e o VLT1 interage com as células que revestem a cavidade nasal, mucosa conjuntiva e glândulas de Harder, que desempenham um importante papel na replicação viral e que são determinantes para a infecção (COPPO; HARTLEY; DEVLIN, 2013; BELTRÁN et al., 2017).

O gene UL23 codifica uma enzima do metabolismo nucleotídico denominada timidina quinase (TK). A deleção deste gene está relacionada com a atenuação e diminuição da virulência, assim como ocorre com o gene US4, responsável pela codificação da glicoproteína G (gG). Resultados semelhantes também sugerem que o gene OFR C é um fator de virulência (GARCIA et al., 2016). A proteína reguladora da transcrição, também denominada proteína da célula infectada 4 (ICP4) é

reponsável pela regulação da expressão gênica no início da infecção, sendo consideradas regiões conservadas entre os alphaherpesvírus (JOHNSON et al., 1995; FERRARI et al., 2000; DEVLIN et al., 2006; FUCHS et al., 2007).

O VLTI, como os demais membros da subfamília Alphaherpesvirinae, pode estabelecer latência no sistema nervoso central após a infecção aguda no trato respiratório superior, podendo causar quadros de reinfecções latentes (FUCHS et al., 2007), sendo que o principal sítio é o gânglio do nervo trigêmio. O VLTI é reativado quando as aves portadoras são submetidas a fatores de estresse, tais como vacinação, transporte, início da postura ou muda forçada (WILLIAMS et al., 1992).

2.4.2 Diversidade Viral

Embora as estirpes do VLTI aparentem ser antigenicamente similares em diversos ensaios, tais como imunofluorescência, vírus neutralização e em testes de proteção cruzada, a diferença na virulência tem sido demonstrada em cultivos celulares e de embriões de galinhas. Evidências epidemiológicas e moleculares indicam que surtos de LTI, ocorridos nos EUA, foram causados por cepas relacionadas a vacinas (OLDONI; GARCÍA, 2007). A recombinação natural do VLTI ocorre, em condições de campo, entre vírus de vacinas atenuadas, podendo originar estirpes virulentas. Estas recombinações virulentas têm causado um grande impacto na sanidade dos plantéis avícolas (LONCOMAN et al., 2017).

2.4.3 Hospedeiros

O principal hospedeiro natural do VLTI é a galinha, sendo que a doença pode ocorrer em aves de todas as idades, embora os sinais mais característicos sejam observados a partir das três semanas de idade (GUY; GARCIA, 2008). A infecção também já foi descrita em perus, faisões e pavões (CRAWSHAW; BOYCOTT, 1982; BAUTISTA, 2003; PORTZ et al., 2008; GARCÍA; SPATZ; GUY, 2013).

2.4.4 Sinais clínicos e lesões

O período de incubação varia entre 6 a 14 dias e a propagação do vírus se inicia a partir de dois dias pós-infecção e quatro dias antes do aparecimento dos sinais clínicos. A severidade da doença é influenciada pela virulência do vírus, nível de estresse das aves, co-infecções com outros patógenos, status do sistema imunidade dos lotes afetados e a idade das aves (GUY; GARCIA, 2008).

Há duas formas de manifestação clínica da doença: severa (epizoótica) ou branda (enzoótica). A forma severa é caracterizada por uma marcante dispneia com expectoração de muco sanguinolento, conjuntivite (de severa a moderada), elevada morbidade, e mortalidade (de moderada a elevada). Pode ocorrer edema dos seios infraorbitários, queda na produção de ovos (poedeiras) e piora na conversão alimentar (frangos de corte). A forma branda é caracterizada por sinais respiratórios leves, com secreção nasal mucoide e persistente e estertores leves, além de edema dos seios nasais. As lesões que podem ocorrer nesta forma incluem sinusite, conjuntivite e traqueíte. O vírus possui afinidade por epitélio respiratório, replicando no epitélio da laringe, traquéia e outras membranas mucosas como a conjuntiva, os sinos respiratórios, sacos aéreos e pulmões (CREELAN et al., 2006; GUY; GARCIA, 2008; GARCÍA; SPATZ; GUY, 2013; MAPA, 2020c).

2.4.5 Transmissão

Pode ocorrer de forma horizontal direta, através do contato de aves saudáveis com aves doentes ou aves portadoras (infecção latente). Também pode ocorrer a transmissão de forma horizontal indireta, através do contato de aves saudáveis com água, alimentos, fômites, pessoas, equipamentos, materiais, veículos, vestuários, produtos, pragas (insetos e roedores), cama, esterco e carcaças contaminadas com o VLT. Não há transmissão vertical (BAGUST; JONES; GUY, 2000; DUFOUR-ZAVALA, 2008; GARCÍA; SPATZ; GUY, 2013; MAPA, 2020c). Uma importante característica da LTI é que aves que foram vacinadas ou que se recuperaram da enfermidade podem carrear o vírus na forma latente (no gânglio do nervo trigêmeo). A latência não é restrita apenas ao gânglio do nervo trigêmeo, mas também pode ocorrer na traqueia, sob a forma de persistência no epitélio traqueal (BAGUST, 1986; COUTO et al., 2015). O vírus pode ser reativado espontaneamente ou sobre

condições de estresse. Esta reativação do VLTl pode transmitir a doença de aves a aves em populações susceptíveis, aumentando a virulência (DUF0UR-ZAVALA, 2008).

2.4.6 Diagnóstico

O diagnóstico do VLTl baseia-se na detecção de corpúsculos de inclusão intranucleares no epitélio do trato respiratório através da histopatologia, isolamento viral, detecção do antígeno viral através da imunofluorescência ou imunohistoquímica, microscopia eletrônica, detecção de anticorpos através de provas sorológica ou detecção do DNA viral em tecidos, por meio de técnicas moleculares de PCR convencional ou PCR em tempo real (qPCR) (TRIPATHY, 2008; CHACON; FERREIRA, 2009; GARCÍA; SPATZ; GUY, 2013; PREIS et al., 2014; OIE, 2018b).

O isolamento viral pode ser realizado através da inoculação de suspensões virais de exsudatos respiratórios e conjuntivais, raspados de traquéia ou tecidos, na membrana córioalantóide (MCA) de ovos embrionados SPF de 9 a 10 dias de incubação. Após dois a cinco dias de inoculação, há produção de placas opacas na MCA ou morte embrionária. Os cultivos celulares primários atualmente utilizados para a propagação de VLTl incluem as células de embrião de fígado (CEL), células de embrião de rim (CK) e fibroblastos de embrião de galinhas (FEG) e as células de linhagem como as células VERO (GUY; GARCIA, 2008; OIE, 2018b). Embora o VLTl venha sendo replicado preferencialmente em cultivos primários, as estirpes de VLTl pouco patogênicas ou silenciosas dificilmente causam efeito citopático no tapete celular mesmo após passagens consecutivas (SELLERS et al., 2004).

Anticorpos específicos para o VLTl podem ser detectados nos testes sorológicos através das técnicas de vírus neutralização, ágar gel imunodifusão, imunohistoquímica, imunofluorescência indireta e ELISA (YORK; FAHEY; BAGUST, 1983; CRESPO et al., 2007; GODOY et al., 2013; SHEHATA et al., 2013; PREIS et al., 2014; YAVUZ et al., 2018; KUMAR et al., 2019).

O diagnóstico molecular para a detecção de DNA do VLTl pode ser realizado através das técnicas de PCR convencional, qPCR e nested-PCR, que são altamente sensíveis e específicas (CALLISON et al., 2007; CHACÓN; FERREIRA, 2008; MAHMOUDIAN et al., 2011; ZHAO et al., 2013; LONCOMAN, et al., 2017b). A

associação desses métodos com a técnica de polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (RFLP) e o sequenciamento de DNA viral permite a diferenciação de isolados virais e cepas vacinais, contribuindo em estudos epidemiológicos e filogenéticos (CREELAN et al., 2006; KIRKPATRICK et al., 2006; CALLISON et al., 2009; CHACON; FERREIRA, 2009; CHACON et al., 2015). A técnica de PCR-RFLP foi utilizada em regiões dos genes TK, gE, gC e ICP4, possibilitando a diferenciação de três genótipos do VLT1 (CHACON; MIZUMA; PIANTINO FERREIRA, 2010).

O vírus pode ser detectado na conjuntiva e no gânglio do nervo trigêmeo, tanto em infecções clínicas como subclínicas (CHACÓN; FERREIRA, 2008). O DNA do VLT1 foi detectado em amostras de traqueia, glândula de Harder, pulmão, rins, fezes e peneira por até 28 dias pós-infecção (dpi), em aves SPF infectadas com estirpes vacinais do VLT1 (ROY et al., 2015), sendo que o bulbo da pena também pode ser utilizado para detecção molecular do VLT1 (DAVIDSON et al., 2016).

A técnica de *high-resolution melting* (HRM) ou curva de melting foi padronizada para classificar estirpes do VLT1, possibilitando a genotipagem e classificação do VLT1, além de detectar eventos de recombinação viral, durante a ocorrência de surtos (FAKHRI et al., 2019).

Um método de amplificação isotérmica mediada por *loop* (*loop-mediated isothermal amplification* - LAMP) foi desenvolvido para o diagnóstico molecular do VLT1, permitindo a detecção de 0,06 pg/μL (equivalente a 353 cópias de DNA/μL). Esta técnica foi cerca de 100 vezes mais sensível que o PCR utilizado nas condições em que o experimento foi conduzido (YU et al., 2020).

Com o advento da tecnologia do sequenciamento NGS foi possível ampliar o conhecimento das variações genéticas com elevada precisão, sendo uma ferramenta útil para a identificação de mutações em genes relacionadas com alta e baixa virulência (GOWTHAMAN et al., 2020). O primeiro relato de genoma completo do VLT1, utilizando NGS foi realizado por Lee e colaboradores (2011), sendo que, em 2012, foram descritos genomas completos de quatro estirpes virulentas do VLT1, isoladas nos Estados Unidos (SPATZ et al., 2012). Em 2013, foram sequenciadas duas estirpes vacinais do VLT1 (CEO e TCO), através desta metodologia (GARCÍA et al., 2013). Em 2017, foi realizado um estudo de filogenia e genômica referentes à circulação de VLT1 em aves de subsistência, com a finalidade de obter a identidade genética de estirpes de campo que não apresentassem

interferência com utilização de cepas vacinais (SPATZ et al., 2017). Loncoman et al. (2017) utilizaram a técnica de NGS para identificar os pontos críticos do genoma de VLTI em que ocorrem, com maior frequência, os mecanismos de recombinação viral no hospedeiro natural (galinha). Utilizando o sequenciamento MinION em estirpes norte-americanas do VLTI, foi possível realizar a genotipagem de isolados do VLTI, com rapidez e acurácia, identificando regiões do genoma associadas a mecanismos de recombinação natural do vírus. Este método possibilita melhorar a capacidade de vigilância epidemiológica molecular na identificação de novas estirpes do VLTI (SPATZ et al., 2019).

2.4.7 Legislação oficial para controle de LTI

A LTI é uma doença de notificação obrigatória ao SVO, de qualquer caso suspeito, segundo a IN n° 50, de 24 de setembro de 2013 (BRASIL, 2013b).

O Memorando Circular n° 72, de 11 de dezembro de 2018, autorizou a utilização da vacina recombinante para LTI no plantel avícola nacional, podendo ser realizada a critério do programa sanitário de cada empresa ou produtor, desde que sejam utilizadas vacinas devidamente registradas no MAPA e com indicação e uso para as espécies em questão. A mesma legislação trata a respeito da proibição no Brasil, da utilização de vacinas vivas para LTI, podendo ser autorizado apenas o uso da vacina viva de cultivo celular (TCO), conforme a situação epidemiológica do caso em questão e do atendimento de requisitos e procedimentos para a autorização e controle do uso destas vacinas (BRASIL, 2018). Para ser autorizada a liberação da vacina TCO, deve ser apresentado um “plano de uso e controle da vacina viva TCO para LTI”, desde que haja:

- comprovação da circulação viral do LTI em uma determinada região, com histórico de notificação ao SVO, com repetições de casos pelo período de pelo menos 3 meses;
- envolvimento de um grande quantitativo de granjas/aves e que seja feita a opção de manter essas aves vivas, em detrimento de seu possível sacrifício ou abate sanitário;
- delimitação da área com as granjas a serem vacinadas e quantificação de granjas e aves a serem vacinadas e a quantidade de aves que não serão vacinadas;

- comprovação de que as propriedades e as granjas estão devidamente registradas no SVO, cumprindo as legislações vigentes do MAPA;

- apresentação de medidas adicionais de biossegurança a serem aplicadas nas granjas, com destaque aos procedimentos para o tratamento, movimentação e destinação de aves mortas, esterco e cama dos aviários (BRASIL, 2018).

A ficha técnica “Laringotraqueíte infecciosa das aves (LTI)” também foi publicada, trazendo informações sobre a doença, as medidas a serem aplicadas no caso de caso suspeito ou provável de LTI (MAPA, 2020c).

2.4.8 Controle e monitoramento

O controle da LTI baseia-se na associação entre boas práticas de biossegurança e a vacinação, uma vez que não há tratamento para esta enfermidade (GOWTHAMAN et al., 2020). As medidas de biossegurança incluem limpeza e desinfecção de equipamentos, da granja, dos veículos, educação sanitária, controle de acesso de pessoas, tratamento da cama do aviário, do esterco, de resíduos e vazão sanitário, quando possível (DUFOR-ZAVALA, 2008; MAPA, 2020c). Porém, a prática de vazão sanitário é realizada especialmente em lotes de frangos de corte. A adoção de medidas de educação sanitária para os criadores, produtores e funcionários é de competência do SVO (na ocorrência de surtos) e do responsável técnico das propriedades (na ausência da doença). As pessoas direta e indiretamente envolvidas nas atividades da granja devem ser orientadas quanto às medidas práticas de prevenção (ISHIZUKA, 2019).

Quando um surto da doença é identificado, a área afetada deve ser delimitada, com visitas às propriedades vizinhas pelo SVO para identificar a dispersão da doença. Após a confirmação de LTI pelo diagnóstico laboratorial, deve-se iniciar a vacinação imediatamente, com a finalidade de impedir a disseminação da doença (MAPA, 2020c).

Em áreas endêmicas, a utilização de vacinas tem como objetivo controlar a disseminação e reduzir a virulência, evitando-se misturar aves vacinadas ou expostas à LTI. Os lotes vacinados devem ser identificados para garantir o controle de movimentação de aves para áreas livres da doença (MENENDEZ et al., 2014; MAPA, 2020c).

A primeira vacina comercial, viva e atenuada foi introduzida nos Estados Unidos, entre o final de 1950 e início de 1960, obtida através de múltiplas passagens em ovos embrionados de galinhas, sendo denominada CEO (*chicken embryo origin*) e originada a partir das cepas virulentas Cover e Hudson do VLTI. No final de 1970, foi desenvolvida a vacina TCO (*tissue culture origin*), atenuada por múltiplas passagens em cultivo celular (células de rim ou fígado de embrião de galinhas) para atenuar a cepa virulenta ASL – 6 do VLTI (GARCÍA; ZAVALA, 2019).

Em condições experimentais, ambas as vacinas (CEO e TCO) têm demonstrado proteção contra a mortalidade e sinais clínicos da LTI, reduzindo a replicação e a transmissão do desafio viral (GARCÍA, 2017). Porém, ambas as vacinas desenvolvem uma infecção latente a longo prazo, com o potencial de propagação viral após reativação. Em aves vacinadas com CEO ou TCO, ocorre a detecção precoce do genoma viral no gânglio do nervo trigêmeo, após a vacinação via ocular, sugerindo que o vírus estabelece rapidamente a latência (RODRÍGUEZ-AVILA et al., 2007; GARCÍA; ZAVALA, 2019).

A utilização de vacinas vivas atenuadas pode causar um aumento de virulência, após o contato de ave para ave, causando uma doença respiratória grave e mortalidade (no caso de CEO) ou uma resposta respiratória mais moderada (com TCO) (ESAKI et al., 2013). A replicação viral e a transmissão entre as aves são mais rápidas e abundantes quando se utiliza a vacina CEO, em relação à vacina TCO (RODRÍGUEZ-AVILA et al., 2007). Porém, a vacina CEO possui o potencial de reversão da virulência (GUY; BARNES; SMITH, 1991), podendo se tornar uma cepa circulante e prevalente no campo, contribuindo para a ocorrência de surtos de LTI em operações avícolas (GARCÍA, 2017; PALOMINO-TAPIA et al., 2019). Além disto, podem causar reações adversas significativas, em condições de campo, que resultam em perdas no ganho de peso corporal e piora na conversão alimentar (ZAVALA, 2011).

As vacinas CEO são aplicadas através da água de bebida ou via spray (aspersão); ao contrário das vacinas TCO que, quando aplicadas por essas vias, tem sua proteção vacinal comprometida, aumentando a possibilidade de circulação de subpopulações vacinais mais virulentas em lotes fracamente protegidos. Por esta razão, recomenda-se a aplicação de vacinas TCO de forma individual, através da via ocular (GARCÍA; ZAVALA, 2019).

Outro tipo de vacina, utilizando a tecnologia do DNA recombinante, foi desenvolvido para o controle de LTI. Há diversas vacinas disponíveis, com diferentes tipos de vetores, tais como o vírus da doença de Marek (do inglês, *Marek's disease virus* - MDV), herpesvírus de perus (HVT) e o vírus da varíola ou boubá aviária (*fowlpox virus* - FPV)(GARCIA, 2017).

Alguns exemplos de vacinas recombinantes incluem: vacina FPV-LT, que expressa a glicoproteína B (gB) e a proteína UL-32 (rFPV-LT gB) (DAVISON et al., 2006); vacinas que expressam glicoproteínas I e D (rHVT-LT gI/gD) ou glicoproteína gB (rHVT-LT gB) (HEIN et al., 2008); outras vacinas são bivalentes e induzem resposta imune contra a doença de Marek ou pox aviário, como como rHVT-LT e rFPV-LT, respectivamente.

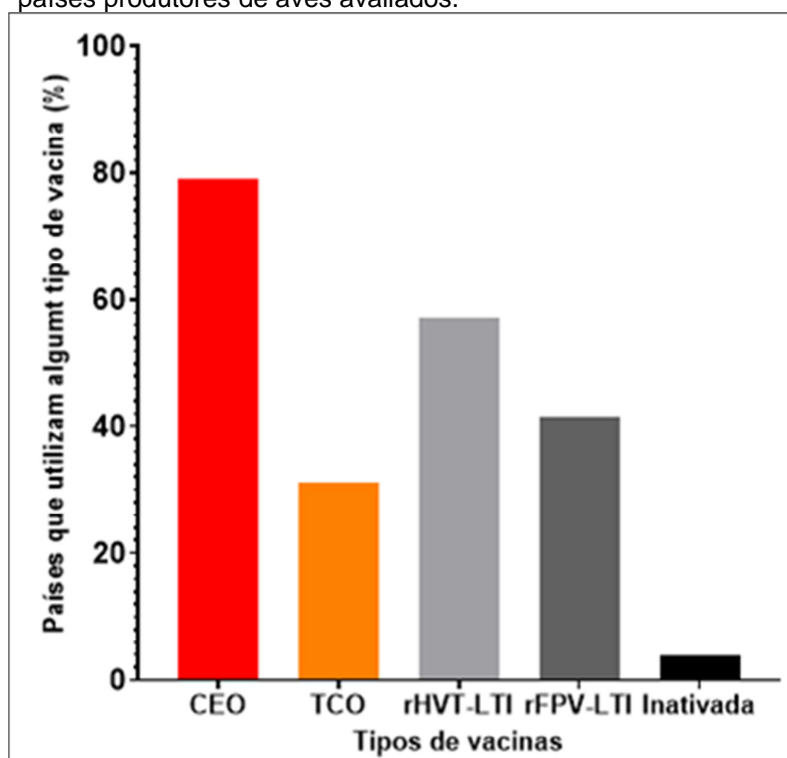
As vacinas recombinantes são extremamente seguras devido à incapacidade de reversão de virulência, transmissão do VLTI entre as aves, impedindo infecções latentes ou recombinação viral (MENENDEZ et al., 2014). Têm sido utilizadas em diversos países, exclusivamente ou associadas com vacinas vivas atenuadas (GARCÍA; ZAVALA, 2019).

Estudos experimentais demonstraram que as vacinas recombinantes reduzem os sinais clínicos da doença, a mortalidade e a diminuição no ganho de peso após o desafio. Estas vacinas concedem uma proteção parcial e auxiliam no combate à LTI, mas não são tão efetivas quanto as vacinas CEO na redução da replicação do vírus na traqueia (GARCÍA; ZAVALA, 2019). Assim sendo, a utilização de tais vacinas não seria indicada em regiões de forte desafio, devido à falha na proteção total contra a LTI. Contudo, em regiões com desafio de leve a moderado, as vacinas recombinantes têm sido eficientes, sendo uma alternativa mais segura em relação à utilização de vacinas CEO (JOHNSON et al., 2010).

Em caso de surtos de LTI, a utilização somente de vacinas recombinantes não tem sido tão eficiente, quando comparadas com o desempenho de vacinas vivas atenuadas. Assim sendo, as vacinas CEO ainda são empregadas para maximizar a proteção contra o VLTI, em países da Europa, Ásia e nos Estados Unidos. Outros países, como Colômbia, utilizam a vacina recombinante associada com a vacina TCO (GARCÍA; ZAVALA, 2019). Algumas estratégias com a associação das vacinas recombinantes (administradas no incubatório) e as vacinas vivas atenuadas (aplicadas como reforço na granja) conferem uma proteção maior e mais duradoura contra a LTI (MAEKAWA et al., 2019).

Em um estudo realizado em 2019, 77 países (74%) dos 104 produtores de aves empregaram a vacinação para o controle da LTI. Entre os tipos de vacinas aplicados por estes países, as vacinas vivas atenuadas foram as mais utilizadas, sendo a vacina CEO aplicada em 79,2% dos países e a vacina TCO em 20,8%. As vacinas recombinantes foram as segundas mais empregadas, em pelo menos 66,2% dos países. A vacina HVT-LTI foi a mais utilizada (57,1%), seguida pela FPV-LTI (41,5%). A vacina inativada foi a menos adotada, correspondendo a apenas 3,9% das vacinas utilizadas no mundo (Figura 10) (GARCÍA; ZAVALA, 2019).

Figura 10 - Tipos de vacinas utilizadas em 77 países dos 104 países produtores de aves avaliados.



Fonte: Adaptado de GARCÍA; ZAVALA (2019).

No Brasil, desde a primeira detecção de LTI, diferentes tipos de vacinas foram licenciados, tais como vacinas vivas atenuadas CEO (Nobilis ILT – cepa Serva – Azko-Nobel/Intervet e LaryngoVac – cepa Cover – Fort Dodge) e a vacina TCO (LTI-IVAX – cepa Samberg – Schering-Plough). Entre as recombinantes vetorizadas, foram autorizadas a utilização das vacinas r-FPV-LT que expressa os genes gB e UL32 (Vectormune FP-LT – CEVA Saúde Animal) e as vacinas r-HVT-LT, com o vetor do vírus de Marek, que podem expressar os genes gB ou genes D e I (Vectormune HVT-LT, sorotipo 3 de HVT – CEVA Saúde Animal) e Innovax-ILT

(cepa HVT/ILT-138 – MSD Saúde Animal) (ISHIZUKA, 2019). Vacinas trivalentes, como rFPV-LT-AE (Vectormune FP LT + AE, CEVA Saúde Animal também já foram licenciadas no país (CEVA, 2020).

2.4.9 Estudos anteriores e cenário atual

A doença foi descrita pela primeira vez por May e Thittsler em 1925, nos Estados Unidos e, posteriormente na Austrália, Reino Unido e Europa. Foi inicialmente referida como difteria aviária, sendo designada como LTI em 1931 (GUY; GARCIA, 2008).

Os surtos de LTI foram reportados nos Estados Unidos, Canadá, Austrália, China e sul da Ásia. Entre 2000 e 2013, a doença foi reportada em mais de 100 países (MENENDEZ et al., 2014; GOWTHAMAN et al., 2020).

Atualmente, LTI tem ocorrido na maioria dos países, sendo considerada uma enfermidade com destacada importância. De 2006 até presente momento, ocorreram surtos nos Estados Unidos, Canadá, Europa, Austrália, China, Egito, Sul da Ásia, Iraque, Namíbia e Brasil (GOWTHAMAN et al., 2020).

No Brasil, o primeiro isolamento do VLTI ocorreu em 1973, em Petrópolis, no estado do Rio de Janeiro (RJ), em aves com sinais respiratórios e traqueíte hemorrágica (HIPÓLITO et al., 1974). Em 1980, foi isolado um VLTI caracterizado como de baixa patogenicidade (SOARES; LA; OAC, 1980). Em 1982, foi relatado o primeiro surto em poedeiras, em Petrópolis (RJ) (ARAÚJO, 1982). A detecção de anticorpos contra o VLTI foi descrita no Rio Grande do Sul (RS), em 1995 (BELTRÃO et al., 2004). Apesar dos relatos científicos, a ocorrência da LTI nestes locais não foi notificada ao SVO e, com isso, nenhuma medida para o controle foi empregada (BUCHALA, 2008).

A doença só foi notificada oficialmente em 27/12/2002, quando ocorreu um surto em aves de postura, na região de Bastos, no estado de São Paulo (ITO et al., 2003; BUCHALA, 2008).

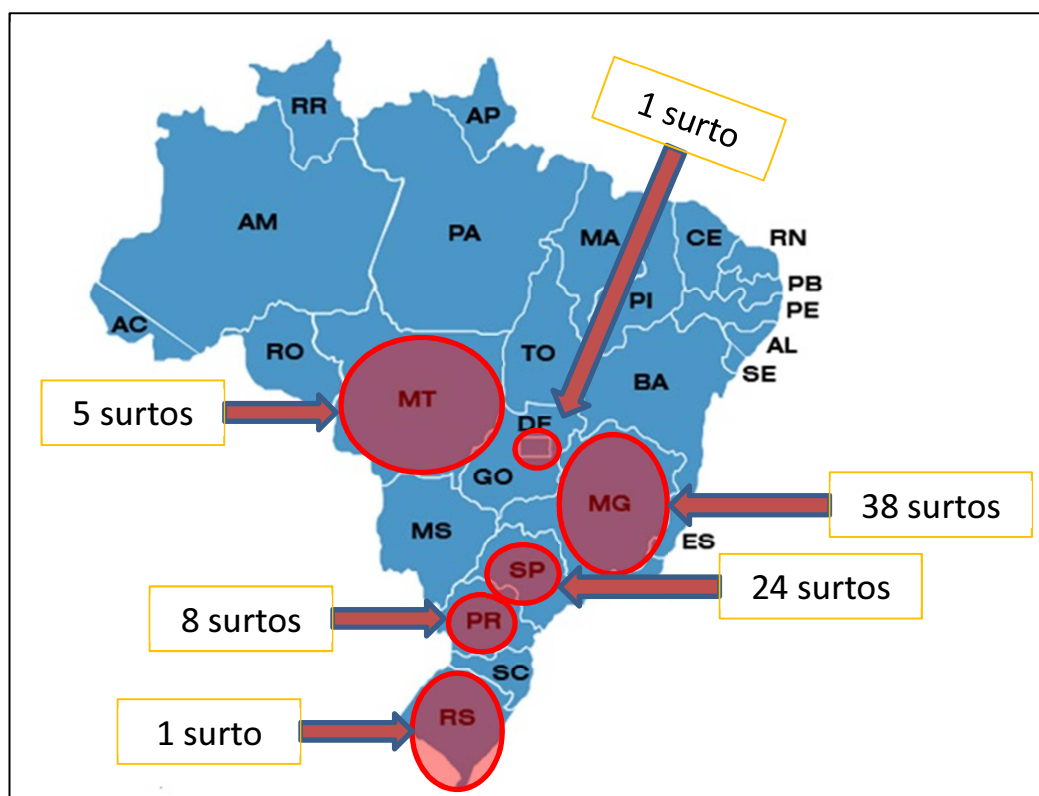
Em dezembro de 2009, foi notificada ao EDA de Ribeirão Preto a suspeita de ocorrência de LTI em Guatapará, sendo que houve a confirmação laboratorial, com resultados de PCR e isolamento positivos para o VLTI. Foi determinado o abate sanitário do lote positivo para LTI, além de medidas de controle como colheita

seletiva de ovos, entrega seletiva de ração, limpeza, desinfecção e vazio sanitário dos galpões que alojavam as aves positivas (FARRA, 2014).

A primeira notificação de LTI em Minas Gerais ocorreu em novembro de 2010, na região denominada Terras Altas da Mantiqueira, sendo que a suspeita foi fundamentada com base nos sinais clínicos, lesões anatomopatológicas, no aumento da mortalidade em aves e na prova de PCR para detecção do gene ICP4 do VLTJ (PREIS et al., 2013). O surto envolveu 5 municípios da região: Itamonte, Itanhandu, Passa Quatro, Pouso Alto e Pedralva (BRASIL, 2010).

A Figura 11 e a Tabela 1 apresentam os surtos de LTI, ocorridos no Brasil e reportados à OIE, no período de 2003 a 2020.

Figura 11 - Surtos de LTI ocorridos no Brasil entre 2003 a 2020 e notificados à OIE



Fonte: Luciano (2020).

Legenda: as áreas delimitadas em vermelho indicam os estados brasileiros onde foram reportados surtos de LTI.

Tabela 1 – Notificações de surtos de LTI ocorridos no Brasil e reportados à OIE, no período de 2003 a 2020

ANO	Nº TOTAL DE SURTOS	LOCAL (Nº SURTOS)
2003	19	SP (19)
2004	-	-
2005	-	-
2006	-	-
2007	-	-
2008	10	DF (1) PR (8) RS (1)
2009	-	-
2010	3	MG (3)
2011	-	-
2012	31	MG (31)
2013	-	-
2014	*	NI
2015	1	SP (1)
2016	6	MT (4) SP (2)
2017	7	SP (2) MT (1) MG (4)
2018	*	NI
2019	*	NI
2020	NI	NI

Fonte: OIE (2020e).

Legenda: NI – não informado / DF – Distrito Federal / PR – Paraná / RS – Rio Grande do Sul / MG – Minas Gerais / SP – São Paulo / MT – Mato Grosso

* doença presente, mas sem informação dos dados quantitativos; “-“ sem notificação de surtos.

As medidas adotadas em relação ao surto de Bastos, no período de 2003 a 2005, incluíram: proibição de trânsito interestadual de aves da região, delimitação da área infectada, que foi denominada “bolsão de Bastos” e início de um programa de

vacinação compulsório e em massa, com utilização da vacina CEO contra a LTI, que ocorreu em fevereiro de 2004 (SÃO PAULO, 2004; BUCHALA, 2008).

As vacinas vivas atenuadas CEO foram utilizadas inicialmente para conter os focos (BUCHALA, 2008; CHACÓN; FERREIRA, 2008).

A partir dos resultados obtidos das vigilâncias ativa e passiva empregadas, o último caso clínico de LTI em granjas de postura da região de Bastos foi reportado em maio de 2004, sendo que até maio de 2006 nenhum caso de LTI foi notificado em outras regiões do estado de São Paulo (BUCHALA, 2008). Em novembro de 2005, a região de Bastos foi declarada oficialmente como “controlada com vacinação”, sendo que o programa de controle evoluiu para a fase de consolidação (SÃO PAULO, 2005; BUCHALA, 2008).

Em 2006, houve a substituição da vacina CEO pela TCO, na região do bolsão de Bastos, devido a menor probabilidade de reversão de patogenicidade da vacina por cultivo celular, além da adoção de medidas de manutenção da vigilância epidemiológica, tais como aplicação de questionários (para avaliação das reações pós-vacinais e Investigação epidemiológica) com a finalidade de constatar a eficiência das medidas implantadas. Na ocasião foi utilizada a vacina TCO (BUCHALA, 2008).

Em Guataporã, a primeira suspeita de LTI foi notificada em 02/12/2009 e, após a confirmação do diagnóstico, foram adotadas medidas de biossegurança no sistema de produção, incluindo o estabelecimento de zona de proteção e zona de vigilância, abate de aves de descarte em abatedouro local, manejo de dejetos, desinfecção do ar dos galpões e vacinação em massa com a vacina TCO, que ocorreu em 14 de fevereiro de 2011 até junho de 2013 (SÃO PAULO, 2011).

A utilização de vacinas recombinantes para LTI foi permitida no bolsão de Bastos, através da Portaria CDA nº 02, de 07 de fevereiro de 2012, que estabeleceu normas e critérios para a vacinação contra a LTI, com a vacina recombinante na região, proibindo a utilização de vacinas vivas atenuadas (SÃO PAULO, 2012). Em Guataporã, foi autorizada utilização das vacinas recombinantes através da Portaria CDA nº 40, de 05/07/2013, em substituição à vacina viva atenuada (SÃO PAULO, 2013).

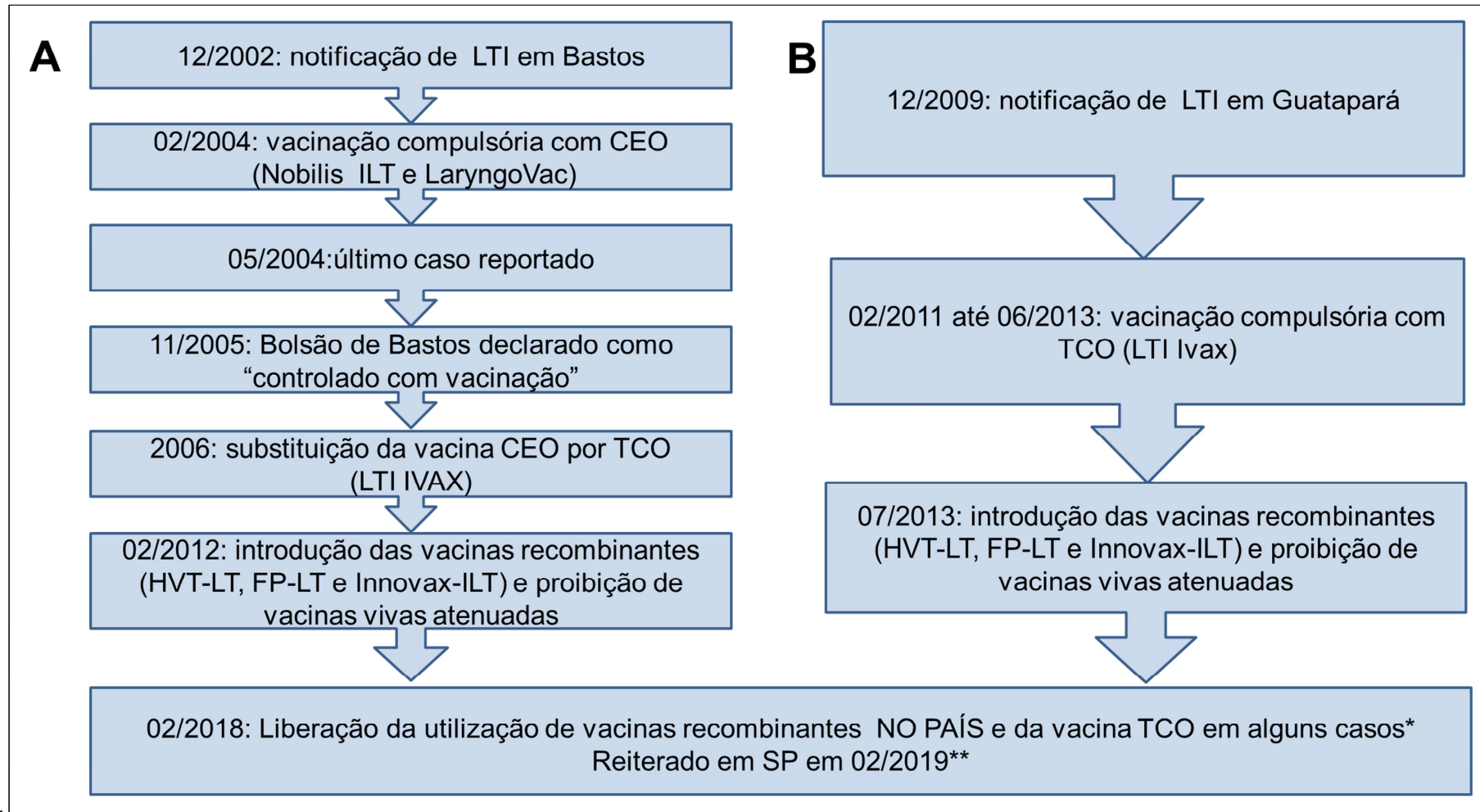
As vacinas recombinantes HVT-LT (CEVA Saúde Animal e MSD Saúde Animal), FP-LT (CEVA Saúde Animal) foram utilizadas nas regiões de Bastos e Guataporã.

Em 11 de dezembro de 2018 foi liberada a utilização de vacinas recombinantes em todo o território brasileiro, bem como a utilização da vacina TCO, desde que ocorra comprovação da circulação viral, situação em que a vacina passa a ser indicada. Porém tal solicitação deverá ser submetida à Defesa Agropecuária e analisada pelo Comitê Estadual de Sanidade Avícola (COESA), com posterior aprovação do MAPA de um “Plano de Uso de Controle da Vacina Viva TCO para LTI”, que considere a situação epidemiológica em questão (BRASIL, 2018).

A partir da Resolução SAA, de 06/02/2019, a LTI foi considerada uma doença de “peculiar interesse” no estado de São Paulo, sendo autorizado o uso de vacinas recombinantes a critério do programa sanitário de cada empresa ou produtor, incluindo a obrigatoriedade da utilização de vacinas recombinantes no bolsão de Bastos e em Guataporã. Em caso de confirmação de LTI, esta legislação permitiu que o produtor pudesse utilizar a vacina viva atenuada TCO, desde com autorização prévia do MAPA e do Comitê Estadual de Sanidade Avícola (COESA/SP) (SÃO PAULO, 2019b).

A Figura 12 contempla a cronologia dos eventos ocorridos nos surtos de Bastos e Guataporã e os esquemas vacinais adotados em cada região.

Figura 12 – Notificações e legislação relacionadas com a vacinação para LTI em Bastos (A) e Guatapar (B)



Fonte: Luciano (2020).

Legenda: * em casos de confirmação de LTI e com autorização prvia do MAPA e do COESA/SP; ** conforme previsto na Resolução SAA, de 06/02/2019.

2.5 SEQUENCIAMENTO DE ALTO DESEMPENHO (NGS)

A tecnologia de sequenciamento de alto desempenho, também denominada “*next generation sequencing*” (NGS), surgiu no final de 2004 e revolucionou os estudos de genômica, promovendo o sequenciamento de bibliotecas de DNA em plataformas capazes de gerar informações de milhões de pares de genes em uma única corrida, reduzindo custos e o tempo de sequenciamento dos genomas (MARGULIES et al., 2005; HEATHER; CHAIN, 2016; PILLAI; GOPALAN; LAM, 2017).

No sequenciamento tradicional, através do método de Sanger, uma única sequência, oriunda de um fragmento específico de DNA é obtida em cada reação. Já no NGS, vários fragmentos diferentes provenientes do mesmo genoma podem ser obtidos em uma única reação. A plataforma mais utilizada para sequenciamento pelo método de Sanger permite produzir 2,88 Mb (megabases) de dados por dia, com uma leitura de 400 a 900 bases. O sequenciamento por NGS, utilizando a plataforma Illumina MiSeq (Illumina) é capaz de gerar de 300 Mb a 15 Gb (Gygabases), com uma leitura de 75 a 600 pb (LIU et al., 2012).

O sequenciamento de alto desempenho gera uma grande quantidade de dados e são necessárias metodologias adequadas para facilitar análise de diversas amostras simultaneamente (KORNELIUSSEN; ALBRECHTSEN; NIELSEN, 2014).

Plataformas de NGS têm sido reconhecidas como ferramentas importantes na medicina veterinária, especialmente na condução de estudos de diversidade viral e desenvolvimento de metagenômica viral (KAPGATE; BARBUDDHE; KUMANAN, 2015).

A análise dos dados obtidos a partir de NGS requer, por parte do pesquisador, um conhecimento múltiplo nas áreas de bioinformática e de biologia (CARVALHO, 2016). Desta maneira, para permitir uma análise desses dados de maneira eficiente, é necessário “workflow” com softwares específicos e expertise na interpretação das informações.

A utilização de ferramentas modernas para a tipificação molecular dos vírus de IA, DNC e LTI é fundamental para o entendimento da epidemiologia da cada uma destas doenças, além de estabelecer a origem dos surtos ocorridos no mundo. Dados comparativos sugerem que os surtos de LTI surgiram de mutações de cepas

silvestres para cepas virulentas, a partir de cepas vacinais (MENENDEZ et al., 2014).

As vantagens do NGS incluem simplicidade, utilização em escala, com aumento do desempenho e produção da DNA polimerase, menor margem de erro e maior viabilidade econômica (DIAZ-SANCHEZ et al., 2013).

O sequenciamento NGS vem sendo amplamente utilizado no estudo de etiologia, genômica, evolução e epidemiologia das doenças infecciosas que acometem os animais, bem como nas interações hospedeiro-patógeno. Também pode ser uma ferramenta fundamental para a produção de dados, utilizados na epidemiologia molecular, com a finalidade de rastrear rapidamente a origem e a transmissão de surtos, auxiliando nas estratégias de intervenção e controle de enfermidades (VAN BORM et al., 2015).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Contribuir para a avaliação dos programas sanitários implementados pelo PNSA através da vigilância epidemiológica dos principais vírus respiratórios que ameaçam a avicultura comercial brasileira.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- A)** Padronizar e validar os testes moleculares de PCR e PCR em tempo real para a detecção do VIA, VDNC e VLTI;
- B)** Realizar a vigilância epidemiológica da VIA e VDNC nas criações de aves de subsistência localizadas em propriedades adjacentes aos compartimentos de aves reprodutoras;
- C)** Realizar a vigilância epidemiológica do VLTI nas criações de aves de postura comercial em duas regiões quarentemadas (Bastos e Guatapar), no período de 2010 a 2018;
- D)** Caracterizar molecularmente os virus identificados nas regioes e correlacioná-los com os programas de vacinaoes implementados nas regioes;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 AMOSTRAS

As amostras utilizadas neste estudo foram coletadas pela Coordenadoria de Defesa Agropecuária de São Paulo (CDA-SP) e cedidas ao Centro Avançado de Pesquisa Avícola do Instituto Biológico (CEAV-IB), localizado em Descalvado-SP. A utilização destas amostras está em conformidade com as diretrizes da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (registro CEUA – FMVZ – USP nº 5201091216).

As amostras foram provenientes de coletas periódicas de suabes traqueais e cloacais de aves de subsistência em propriedades no entorno de estabelecimentos avícolas localizados em três municípios do noroeste paulista. Coletas de suabes traqueais de aves de postura comercial em granjas localizadas nas regiões de Bastos e Guatapar também foram realizadas pela CDA-SP. A amostragem total utilizada neste estudo foi constituída de 3.688 amostras de pools, contendo 1 a 5 suabes traqueais e 110 amostras de pools, com 1-5 suabes cloacais, totalizando 15.330 aves, coletadas a partir de 606 galinhas de subsistência, 14.700 galinhas de postura comercial, 10 codornas, 10 patos, 03 gansos e 01 peru (Tabela 2).

Tabela 2 – Distribuio das amostras coletadas das aves para o diagnóstico molecular de IA, DNC e LTI, por espécies

ESPÉCIE	N POOLS DE SUABES TRAQUEAIS (ST)	N POOLS DE SUABES CLOACAIS (SC)	N AVES COLETADAS
AVES DE SUBSISTÊNCIA	102	102	606
AVES DE POSTURA COMERCIAL	3.578	-	14.700
CODORNA	02	02	10
PATO	03	03	10
GANSO	02	02	03
PERU	01	01	01
TOTAL	3.668	110	15.330

Fonte: Luciano (2020).

4.1.1 Influenza aviária e doença de Newcastle

O tamanho das amostras foi calculado, a partir da fórmula preconizada por Vieira (2011):

$$n = \frac{Z^2 * F * q}{e^2}$$

Sendo:

n = tamanho da amostra

Z= valor da distribuição normal para grau de confiança de 95%

F = frequência estimada

q = (1-F)

e = erro máximo aceitável

Foram utilizadas as seguintes bases estatísticas para o delineamento amostral, considerando propriedades de subsistência localizadas no raio de 1 km entorno de granjas de reprodutoras:

- Prevalência estimada (intrapropriedade) = 8% (F)
- Sensibilidade = 99%
- Grau de confiança = 95% (Z= 1,96)
- Erro máximo de 16% de frequência (e)

Então:

$$n = \frac{1,96^2 * 0,08 (1 - 0,16)}{0,16^2} \sim 10 \text{ amostras}$$

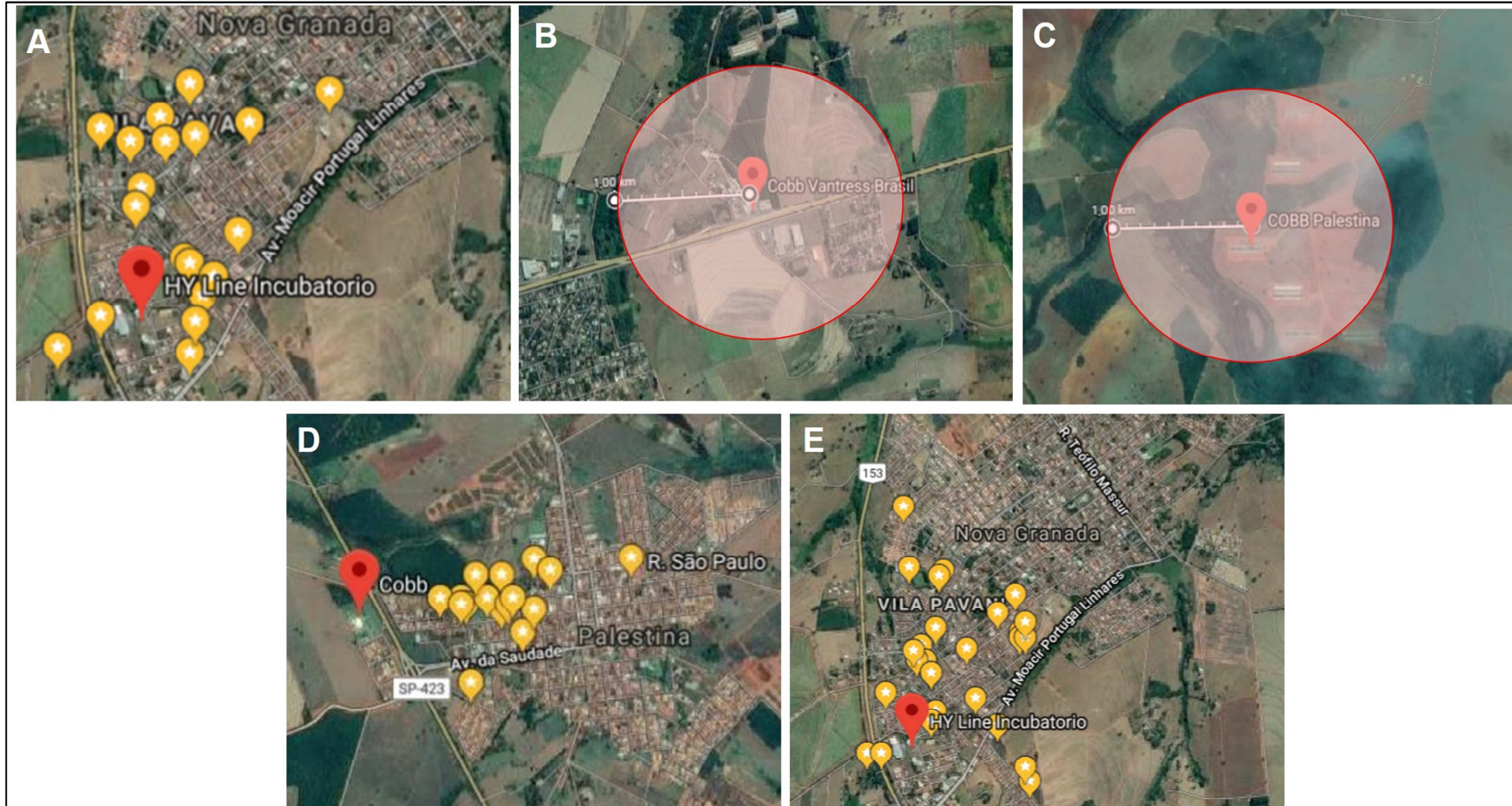
As amostras de suabes traqueais e cloacais foram coletadas em 81 propriedades, que possuíam aves de subsistência ou de “fundo de quintal”, localizadas em um raio de 1 km entorno de propriedades avícolas de reprodutoras, provenientes de três municípios do estado de São Paulo: Palestina, Nova Granada e Guapiaçu (Figura 13, Tabela 3). Tais regiões possuem empresas avícolas de grande porte, com elevado nível de biossegurança, contendo incubatórios e granjas de aves de reprodução (bisavós e avós).

No período de outubro de 2017 a novembro de 2018, foram coletados 110 pools de suabes traqueais e 110 pools de suabes cloacais de 630 aves: 606 galinhas, 10 codornas, 10 patos, 03 gansos e 01 peru (Tabela 3). Estas amostras foram utilizadas para o diagnóstico molecular do VIA e do VDNC.

Os suabes de traqueais e cloacais foram agrupados em pools de 5 a 10 aves cada, totalizando 1 a 2 amostras de cada tipo de suabe por propriedade. Nas propriedades que havia outras espécies de aves (tais como codorna, ganso, peru e pato) também foram coletadas amostras das mesmas, sendo agrupadas em pools separadamente. Nas propriedades com menos de 05 aves, foi coletado um pool com o número total de aves do local.

Os suabes foram colocados em tubos coletores com meio BHI ou Caldo Triptose Fosfato (TPB), contendo antibióticos, sendo refrigerado entre 2°C a 8°C, até serem entregues ao CEAV. A partir daí, foram armazenadas a -80°C até o momento do processamento.

Figura 13 - Localização das propriedades com aves de subsistência, no raio de 1 km dos diferentes tipos de propriedades avícolas.



Fonte: Google Maps, adaptado por Luciano (2020).

Legenda: A) Incubatório de avós, localizado em Nova Granada – SP; B) Granja de avozeiro, localizada em Guapiaçu-SP; C) Incubatório de Bisavós, localizado em Palestina – SP; D) Incubatório de Bisavós, localizado em Palestina – SP; E) Incubatório de avós, localizado em Nova Granada – SP.

Tabela 3 – Distribuição dos estabelecimentos com aves de subsistência localizadas no raio de 1 km entorno das propriedades avícolas com reprodutoras comerciais

Finalidade das empresas avícolas de reprodução	Município	Número de Estabelecimentos de aves de Subsistência¹	Espécie	Nº pools de suabe traqueal	Nº pools de suabe cloacal	Total de Aves de subsistência
Incubatório (bisavós)	Palestina	21	Galinha	34	34	162
			Codorna	02	02	10
			Pato	01	01	04
Incubatório (avós)	Nova granada	51	Galinha	54	54	373
			Ganso	01	01	01
			Pato	02	02	06
			Peru	01	01	01
Avozeiro	Guapiaçu	09	Galinha	14	14	71
			Ganso	01	01	02
Total		81		110	110	630

¹ Propriedades com aves de subsistência ou de “fundo de quintal”, localizadas no raio de 1 km entorno de propriedades avícolas de reprodutoras.
Fonte: Luciano (2020).

4.1.2 Laringotraqueíte infecciosa das galinhas

No período de dezembro de 2010 a dezembro de 2018, foram coletadas 3.578 amostras de pools de aves postura comercial, sendo que cada amostra foi constituída de 3 a 5 suabes traqueais, totalizando 14.700 aves, com idades de 8 a 100 semanas, coletadas de 578 lotes de granjas de postura comercial localizadas nas regiões de Bastos e Guatapar, no estado de São Paulo (Tabela 4 e Figura 14A). A região de Bastos inclui 11 municípios, onde foram realizadas as coletas: Herculândia, Iacri, João Ramalho, Luclia, Osvaldo Cruz, Parapu, Queiroz, Quintana, Rancharia, Rinópolis e Tup (Figura 14B). As coletas das granjas da região de Guatapar da região de Guatapar Todas as granjas coletadas na região de Guatapar foram coletadas no município de Guatapar (Figura 14C).

Houve variao na composio de pools de cada amostra e a amostragem não foi uniforme no decorrer dos anos (2010-2018). Tal fato ocorreu devido a delineamentos epidemiológicos e estatísticos, realizados pelo serviço oficial de defesa agropecuária (CDA/SP), os quais foram sendo modificados e adaptados, conforme as necessidades e aoes de cada região avaliada (vacinao, inquéritos e evoluo da enfermidade). As amostras foram provenientes da vigilância ativa realizada pelo serviço oficial. Em 2010, não houve coleta no bolsão de Bastos, enquanto nos anos de 2012, 2014 e 2015 não ocorreram coletas em Guatapar. Nestas ocasiões, a vigilância foi passiva, sendo que os materiais coletados foram direcionados para o Laboratório Federal de Defesa Agropecuária (LFDA/SP).

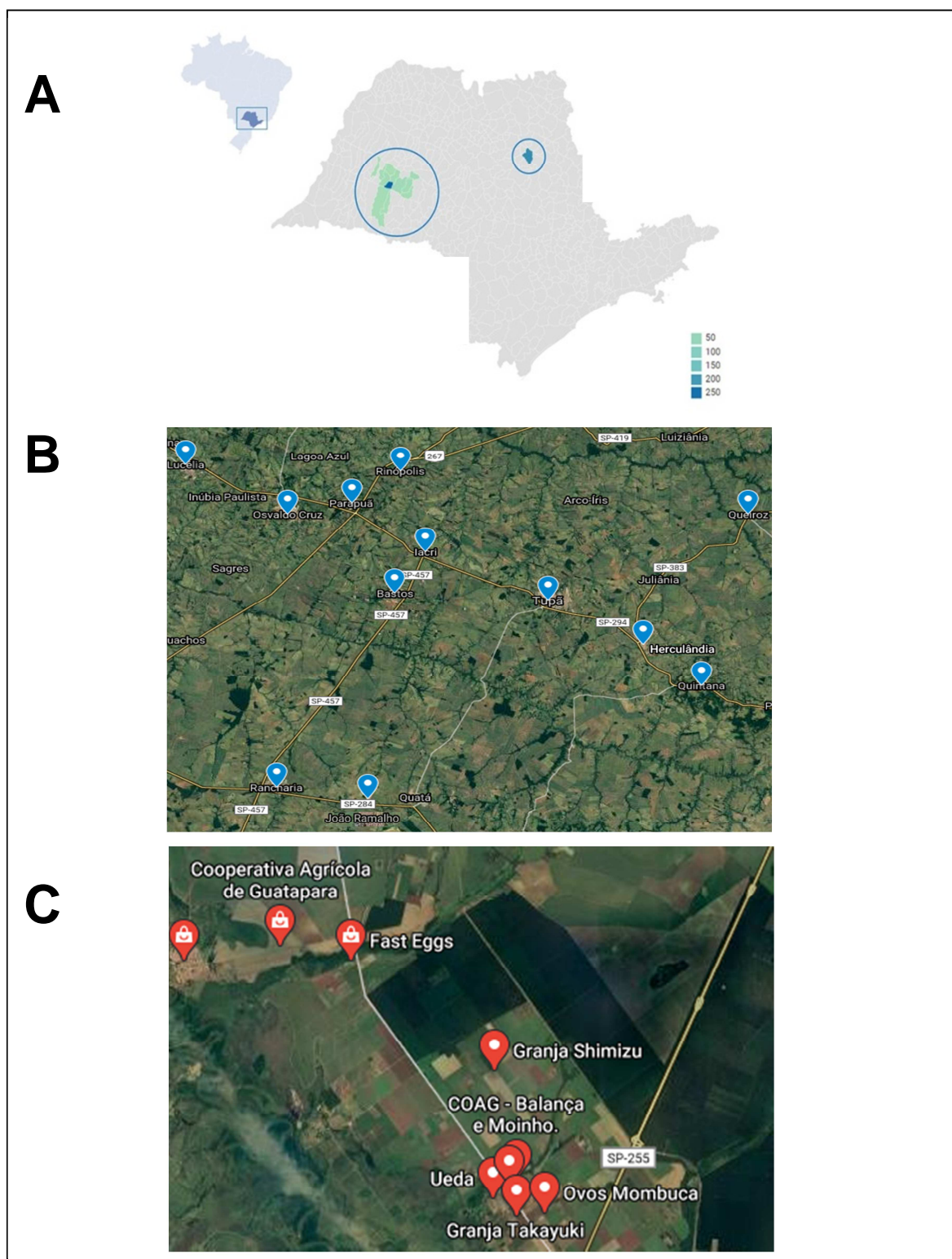
Tabela 4 – Relação das amostras de suabe traqueal coletadas para o diagnóstico molecular de LTI nas regiões de Bastos e Guatapar, no período de 2010 a 2018

ANO	LOCAL	N LOTES	N POOLS/AMOSTRA	TOTAL DE AMOSTRAS	COMPOSIÇÃO DE CADA POOL	N AVES COLETADAS
2010	Bolsão de Bastos	CNR	-	-	NA	0
	Guatapar	38	5 pools	190	5 ST	950
2011	Bolsão de Bastos	1	24 pools	24	5 ST	120
		1	12 pools	12	5 ST	60
	Guatapar	45	12 pools	540	5 ST	2700
2012	Bolsão de Bastos	4	12 pools	48	5 ST	240
	Guatapar	CNR	-	-	NA	0
2013	Bolsão de Bastos	49	5 pools	245	5 ST	1225
		2	12 pools	24	5 ST	120
	Guatapar	41	5 pools	205	3 ST	615
2014	Bolsão de Bastos	48	3 pools	144	5 ST	720
	Guatapar	CNR	-	-	NA	0
2015	Bolsão de Bastos	52	3 pools	156	5 ST	780
	Guatapar	CNR	-	-	NA	0
2016	Bolsão de Bastos	48	5 pools	240	5 ST	1200
	Guatapar	1	3 pools	3	5 ST	15
2017	Bolsão de Bastos	48	3 pools	144	5 ST	720
	Guatapar	46	3 pools	138	5 ST	690
2018	Bolsão de Bastos	15	5 pools	75	5 ST	375
		96	10 pools	960	3 ST	2880
	Guatapar	43	10 pools	430	3 ST	1290
TOTAL		578		3.578		14700

Fonte: Luciano (2020)

Legenda: CNR – coleta não realizada; NA – não se aplica; ST – suabe traqueal

Figura 14 - Localização das propriedades com aves de postura comercial.



Legenda: A) Mapa com identificação das regiões analisadas com distribuição do número de amostras coletadas em cada região B) Região de Bastos – SP, incluindo o município de Bastos e outros 11 municípios; C) Região de Guataparã. – SP
 Fonte: Google Maps, adaptado por Luciano (2020).

4.2 ANÁLISES LABORATORIAIS

As análises laboratoriais foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular do CEAV-IB em Descalvado, SP. Todos os procedimentos foram cumpridos de acordo com os requisitos do sistema de gestão de qualidade que constam na norma ABNT NBR ISO/IEC 17025:2017. As técnicas de diagnóstico utilizadas neste estudo estão de acordo com as metodologias preconizadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE).

As amostras de suabes traqueais e cloacais, utilizadas no diagnóstico molecular foram manipuladas em uma cabine de segurança biológica do tipo II A1, garantindo a proteção da amostra biológica, do operador e do ambiente, durante a fase de extração de ácidos nucleicos totais. O laboratório possui o nível de biossegurança 2.

Todos os equipamentos críticos utilizados nos ensaios realizados (tais como micropipetas, cabine de segurança biológica, fluxos laminares, termocicladores, dentre outros) foram calibrados e certificados por empresas pertencentes à Rede Brasileira de Calibração (RBC), com a finalidade de atingir a exatidão necessária, além de minimizar os erros inerentes aos procedimentos, contribuindo para a garantia da qualidade nos ensaios realizados.

Para evitar a contaminação cruzada entre as amostras, antes e após a utilização da cabine de segurança biológica, dos fluxos e das micropipetas foi realizada a descontaminação e desinfecção das mesmas com solução de hipoclorito a 1%, seguido de limpeza com álcool 70% e 15 minutos de luz ultravioleta.

4.2.1 Vírus utilizados como material de referência – controle positivos

A relação de estirpes virais, utilizadas como controles positivos nos processos de validação das reações, encontra-se descrita no Quadro 1.

Quadro 1 - Estirpes virais utilizadas como material de referência – controles positivos

Agente	Estirpe Viral	Descrição	Fabricante
VIA	A/TY/MN/3689-1551/81 (H5N2)	Antígeno comercial - suspensão de CAM, coletada de ovos embrionados de galinhas SPF, inoculados com o VIA e inativados com β -propiolactona	APHIS – NVSL – USDA – EUA
VDNC	La Sota	Vacina viva originária de ovos embrionados de galinhas SPF inoculados com o VDNC – New-vacin [®]	Biovet – Brasil
VLTi	Cover	Antígeno comercial concentrado - líquido corioalantóide de ovos SPF infectados com a estirpe do VLTi	Charles River Laboratories – EUA
	Serva	Vacina viva originária de ovos embrionados de galinhas SPF (CEO) inoculados com o VLTi – Nobilis ILT [®]	Intervet – Holanda

Fonte: Luciano (2020).

4.2.2 Extração de ácidos nucleicos totais (DNA e RNA)

Os ácidos nucleicos (DNA e RNA total) foram extraídos com a utilização do kit comercial IndiMag Pathogen Kit (Indical Bioscience, EUA), através do processo de extração magnética por beads, com o sistema automatizado de extração de ácidos nucleicos, denominado IndiMag48 (Indical Bioscience, EUA), segundo o protocolo descrito pelo fabricante. Resumidamente, foram distribuídas no cartucho, as soluções:

- 20 μ L da Proteinase K em cada poço da fileira 1;
- 700 μ L da Solução de Lavagem 1 (AW1) na fileira 2;
- 700 μ L da Solução de Lavagem 2 (AW2) na fileira 3;
- 100 μ L do tampão de eluição (AVE) na fileira 4;

Em seguida, foi preparada a mistura do tampão de lise VXL (solução com Buffer VXL, Buffer ACB, MagAttract Suspension e Carrier), sendo adicionados 500 μ L desta solução, juntamente com 200 μ L da amostra em cada poço da fileira 1,

contendo a proteinase K. O cartucho foi transferido para o equipamento IndiMag48, sendo então realizada a extração automatizada dos ácidos nucleicos.

Os ácidos nucleicos das amostras, eluídos em 100 µL da solução AVE, foram transferidos para microtubos, sendo armazenadas entre 2°C a 8°C (quando processadas imediatamente após a extração) ou a -80°C até o momento do processamento das reações moleculares.

4.2.3 Extração de DNA (diagnóstico molecular de LTI)

O DNA foi extraído com a utilização do kit comercial Pure Link Genomic DNA® (Thermo Fisher, EUA), segundo o protocolo descrito pelo fabricante, com algumas adaptações.

Resumidamente, adicionou-se 20 µL de proteinase K e 20 µL de RNase em tubos de 1,5 mL, juntamente com 200 µL de cada amostra de suabe traqueal. Em seguida, as amostras foram vortexadas por aproximadamente 30 segundos e incubadas por 2 minutos a temperatura ambiente. Acrescentou-se 200 µL de Pure Link Genomic Lysis Binding Buffer, com homogeneização por vórtex por aproximadamente 20 segundos. As amostras foram transferidas para o Thermo Mixer e incubadas a $56^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$, com agitação entre $8-9 \times 100 \text{ min}^{-1}$, por 15 minutos. Após este período, adicionou-se 200 µL de etanol puro e absoluto, com homogeneização por 5 segundos. O lisado (preparação contendo as amostras e todos os reagentes adicionados) foi aplicado nas colunas de sílica do kit, acopladas em tubos coletores de 2 mL, sendo centrifugadas a 12.000 rpm por 2 minutos, a 4°C. Os tubos coletores foram descartados, transferindo as colunas de extração para o primeiro conjunto de tubos coletores previamente separados. Adicionou-se 500 µL do Tampão de Lavagem 1 em cada coluna, com posterior centrifugação a 12.000 rpm por 2 minutos, a 4°C, sendo que o filtrado foi descartado com os tubos coletores. Depois foram acrescentados 500 µL do Tampão de lavagem 2, com centrifugação a 13.000 rpm por 3 minutos, a 4°C. Os tubos coletores foram descartados, juntamente com o seu conteúdo e as colunas foram transferidas para a segunda série de tubos de coletores, sendo centrifugadas a 13.200 rpm por 1 minuto, a 4°C. As colunas foram transferidas para tubos de 1,5 mL, sendo então distribuídos 100 µL de tampão de eluição, com incubação por 5 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, as colunas foram centrifugadas a 13.200 rpm

por 2 minutos, à 4°C, com posterior armazenamento das amostras de DNA a 4°C, caso fossem processadas imediatamente ou a -20°C (para processamento posterior).

4.3 DIAGNÓSTICO MOLECULAR PARA DETECÇÃO DO GENE M DO VIA

4.3.1 Reação de Transcrição Reversa – PCR em tempo real para IA (RRT-PCR VIA)

As amostras de RNA foram submetidas ao diagnóstico molecular para detecção do gene da matriz (M) do vírus de influenza aviária, através da reação de transcrição reversa, seguida de PCR em tempo real (RRT-PCR).

Foi utilizado o kit comercial AgPath ID One Step RT-PCR (Ambion, EUA), segundo as instruções do fabricante. A reação de RRT-PCR utilizou uma sonda marcada com o *reporter* FAM e o *quencher* BHQ1, além de incluir o ROX como referência passiva. Os primers e probe utilizados neste estudo foram descritos por Spackman e colaboradores (2002). As sequências dos oligonucleotídeos utilizados e o tamanho do fragmento produzido para VIA estão descritos no Quadro 2.

Quadro 2 - Sequências dos oligonucleotídeos (primers e sonda) utilizados nas reações de RRT-PCR para detecção do gene M do VIA

NOME	SEQUÊNCIA	PRODUTO
M+25	5' AGA TGA GTC TTC TAA CCG AGG TCG 3'	99 pb
M+64	5' FAM – TCA GGC CCC CTC AAA GCC GA – BHQ1 3'	
M-124	5' TGC AAA AAC ATC TTC AAG TCT CTG 3'	

Fonte: Spackman (2002).

Em cada reação foram adicionados dois controles positivos e dois controles negativos (água livre de nucleases).

A reação de RRT-qPCR IA utilizou 2,0 µL de água livre de nucleases, 12,5 µL do tampão (2X RT-PCR), 0,50 µL do primer M+25 (20pmol/ µL), 0,5 µL do primer M-124 (20 pmol/ µL), 0,5 µL da sonda M+64 (6 pmol/ µL), 1,0 µL da enzima (25X RT-PCR Enzyme Mix) e 8 µL da amostra de RNA, totalizando um volume final de 25 µL.

Foi utilizada a plataforma 7500 *Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems)*, cuja programação consistiu de 01 ciclo de 45°C por 10 minutos, 01

ciclo de 95°C por 10 minutos, 45 ciclos de 94°C por 15 segundos e 60°C por 30 segundos (ponto de coleta dos dados). A leitura e análise das reações foram realizadas através do programa *7500 Software* versão 2.3.

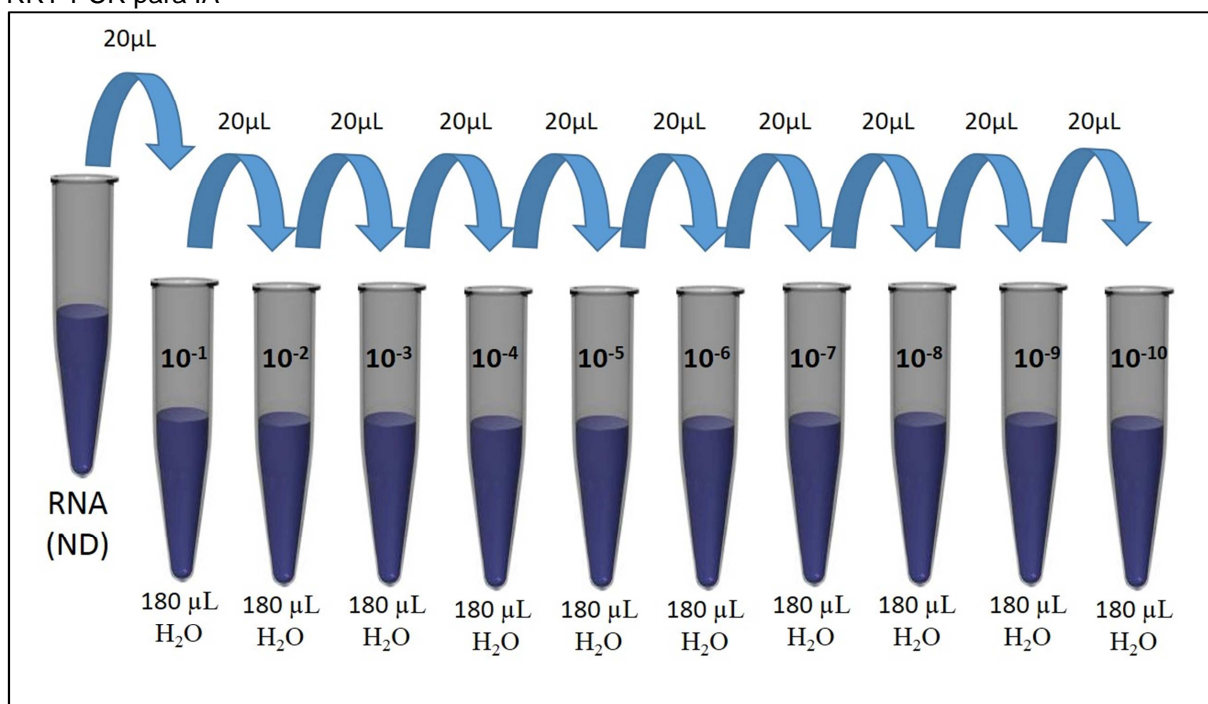
4.3.2 Validação da técnica

4.3.2.1 Curva padrão

A amostra de controle positivo do vírus de IA foi submetida à extração automatizada de RNA, utilizando-se o kit de extração IndiMag Pathogen Kit (Indical BioScience) e o equipamento IndiMag 48, conforme descrito no item 4.2.2.

O RNA extraído do controle positivo foi diluído em série, na base 10 (de 10^{-1} a 10^{-10}), utilizando-se água livre de nucleases (Figura 15).

Figura 15 - Diluição em série do RNA utilizado como controle positivo para validação da técnica de RRT-PCR para IA



Legenda: ND: não diluído.

Fonte: Luciano (2020).

O RNA proveniente da extração, juntamente com as diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-10}), foi submetido à reação de RRT-PCR, segundo descrito no item 4.3.1.

Os parâmetros para a validação do ensaio foram estabelecidos:

- pelo menos um controle positivo deveria apresentar uma curva sigmoide (em forma de S) e um CT (ciclo Threshold) entre 25 a 29;
- o threshold deveria cruzar o meio da fase exponencial das curvas de amplificação dos controles positivos;
- os controles negativo deveriam ter CT indeterminado ou não detectado (ND);
- a curva padrão deveria apresentar eficiência de 90 a 100%, slope entre -3,3 e -3,5 e coeficiente de correlação (R2) maior que 0,99;

4.3.2.2 Limite de detecção

O limite de detecção foi considerado como a última diluição que apresentou um valor de CT detectado pelo equipamento.

4.3.3 Interpretação dos resultados

O threshold utilizado para as análises das amostras foi o mesmo determinado pelo melhor valor de eficiência (próximo a 100%) da curva padrão (3.3.2.1).

Para a validação do ensaio, pelo menos um controle positivo apresentou uma curva sigmoide (em forma de S) e o CT do controle negativo foi indeterminado ou não detectado.

O controle negativo apresentou traços de fluorescência na linha de base durante todo o ensaio (45 ciclos), porém sem curva de amplificação. Amostras com CT abaixo de 40 foram consideradas **positivas**, amostras com CT indeterminado (não detectado) foram consideradas **negativas**.

4.4 DIAGNÓSTICO MOLECULAR PARA DETECÇÃO DO GENE M DO VDNC

4.4.1 Reação de Transcrição Reversa – PCR em tempo real para DNC (RRT-PCR DNC)

As amostras de RNA foram submetidas ao diagnóstico molecular para detecção do gene da matriz (M) do vírus de doença da Newcastle, através da reação de transcrição reversa, seguida de PCR em tempo real (RRT-PCR).

Foi utilizado o kit comercial AgPath ID One Step RT-PCR (Ambion, EUA), segundo as instruções do fabricante. A reação de RRT-PCR utilizou uma sonda marcada com o *reporter* FAM e o *quencher* BHQ1, além de incluir o ROX como referência passiva.

Os primers e probe utilizados neste estudo foram descritos por WISE et al. (2004), utilizado para a detecção tanto de paramixovírus não-virulento (cepas vacinal/lentogênica) quanto de virulento (cepas mesogênica/velogênica). As sequências dos oligonucleotídeos utilizados e o tamanho do fragmento produzido para DNC estão descritos no Quadro 3.

Quadro 3 - Sequências dos oligonucleotídeos (primers e sonda) utilizados nas reações de RRT-PCR para detecção do gene M do VDNC

NOME	SEQUÊNCIA (5' – 3')	PRODUTO
M+4100	AGT GAT GTG CTC GGA CCT TC	120 pb
M+4169	FAM – TTC TCT AGC AGT GGG ACA GCC TGC – BHQ1	
M-4220	5' CCT GAG GAG AGG CAT TTG CTA 3'	

Fonte: Wise (2004).

Em cada reação foram adicionados dois controles positivos e dois controles negativos (água livre de nucleases).

A reação de RRT-PCR utilizou 1,0 µL de água livre de nucleases, 12,5 µL do tampão (2X RT-PCR), 1,0 µL do primer M+4100 (20pmol/ µL), 1,0 µL do primer M-4220 (20pmol/ µL), 0,5 µL da sonda M+4169 (6pmol/ µL), 1,0 µL da enzima (25X RT-PCR Enzyme Mix) e 8 µL da amostra, totalizando um volume final de 25 µL.

Foi utilizada a plataforma *7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems)*, cuja programação consistiu de 01 ciclo de 45°C por 10 minutos, 01 ciclo de 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 94°C por 10 segundos e 52°C por 30 segundos (ponto de coleta dos dados) e, para finalizar, 72°C por 10 segundos. A leitura e análise das reações foram realizadas através do programa *7500 Software* versão 2.3.

4.4.2 Validação da técnica

4.4.2.1 Curva padrão

A amostra de controle positivo do vírus de DNC foi submetida à extração automatizada de RNA, utilizando-se o kit de extração IndiMag Pathogen Kit (Indical BioScience) e o equipamento IndiMag 48, conforme descrito no item 4.2.2.

O RNA extraído do controle positivo foi diluído em série, na base 10 (de 10^{-1} a 10^{-10}), utilizando-se água livre de nucleases, como realizado para o vírus de influenza aviária (Figura 15).

O RNA proveniente da extração, juntamente com as diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-10}) foram submetidos à reação de RRT-PCR, segundo descrito no item 4.4.1.

Os parâmetros para a validação do ensaio foram estabelecidos:

- pelo menos um controle positivo deveria apresentar uma curva sigmoide (em forma de S) e um CT entre 25 a 29;
- o threshold deveria cruzar o meio da fase exponencial das curvas de amplificação dos controles positivos;
- os controles negativo deveriam ter CT indeterminado ou não detectado;
- a curva padrão deveria apresentar eficiência de 90 a 100%, slope entre -3,3 e -3,5 e coeficiente de correlação (R^2) maior que 0,99;

4.4.2.2 Limite de detecção

O limite de detecção foi considerado como a última diluição que apresentou um valor de CT detectado pelo equipamento.

4.4.3 Interpretação dos resultados

O threshold utilizado para as análises das amostras foi o mesmo obtido na curva padrão (3.4.2.1).

Para a validação do ensaio, pelo menos um controle positivo apresentou uma curva sigmoide (em forma de S) e o CT do controle negativo foi indeterminado (não detectado).

O controle negativo apresentou traços de fluorescência na linha de base durante todo o ensaio (40 ciclos), porém sem curva de amplificação. Amostras com CT abaixo de 40 foram consideradas **positivas**, amostras com CT indeterminado (não detectado) foram consideradas **negativas**.

4.5 DIAGNÓSTICO MOLECULAR PARA DETECÇÃO DO VLTI

4.5.1 Reação de PCR convencional para detecção do gene ICP4 do VLTI (PCR-LTI-ICP4)

A reação de PCR para LTI utilizou 7,5 µL de água livre de nucleases, 12,5 µL da enzima Go Taq Green Master Mix® (Promega, EUA), 1,25 µL do primer ICP4 sense (10pmol/ µL), 1,25 µL do primer ICP4 anti-sense (10pmol/ µL) e 2,5 µL da amostra, totalizando um volume final de 25 µL. Foram utilizados *primers* sintetizados a partir de sequências da região conservada do gene proteína da célula infectada 4 (ICP4) de LTI, produzindo um fragmento de 688 pb (Quadro 4).

Quadro 4 - Sequências dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR convencional para detecção do gene ICP4 do vírus de LTI

NOME	SEQUÊNCIA	PRODUTO
ICP4 – F	5' ACT GAT AGC TTT TCG TAC AGC ACG 3'	688 pb
ICP4 – R	5' CAT CGG GAC ATT CTC CAG GTA GCA 3'	

Fonte: Chacón e Ferreira (2009).

A reação de PCR foi processada em 1 ciclo de 94°C por 3 minutos, 35 ciclos de 94°C por 1 minuto (desnaturação), 62°C por 1 minuto (anelamento) e 72°C por 1,5 minuto (extensão), seguido de extensão final de 72°C por 10 minutos, sendo utilizado o termociclador DNA Engine PTC-200 (Bio-Rad, EUA).

Em cada reação foram adicionados controles positivos e negativos (água livre de nucleases).

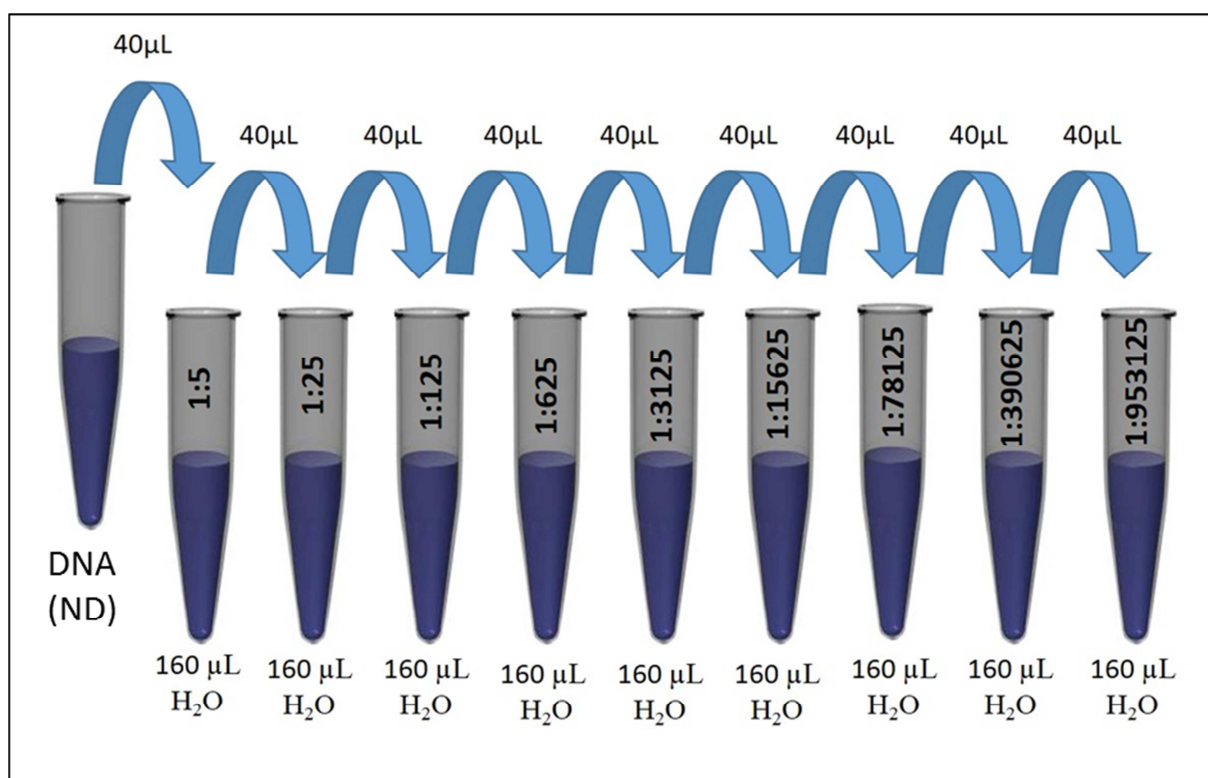
Os produtos amplificados foram visualizados por luz ultravioleta (UV) no transluminador LTB20X20HE (Locus do Brasil, Brasil) após eletroforese com gel de agarose (1,5%) contendo o corante SYBR Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, EUA) em tampão Tris Acetato EDTA (TAE). A corrida foi realizada em 100V, 400 mA por 90 minutos. Como marcador de peso molecular foi utilizado o Low Ranger (Norgen, Canadá).

4.5.1.1 Limite de detecção

A amostra de controle positivo do VLTI foi submetida à extração automatizada de DNA, utilizando-se o kit de extração IndiMag Pathogen Kit (Indical Bioscience, EUA) e o extrator automatizado de ácidos nucleicos IndiMag48, conforme descrito no item 4.2.1.

O DNA extraído do controle positivo foi diluído em série, na base 5 (de 1:5 à 1:1953125), utilizando-se água livre de nucleases (Figura 16).

Figura 16 – Diluição em série para validação da técnica de PCR para LTI



Fonte: Luciano (2020).

Legenda: ND – não diluído.

O DNA proveniente da extração, juntamente com as diluições seriadas (1:5 a 1:1953125) foram submetidas à reação de PCR LTI ICP4, nas condições descritas no item 4.5.1.

O limite de detecção foi considerado como a última diluição que foram detectados presença de banda específica (688 pb) em todas as amostras da triplicata.

4.5.1.2 Interpretação dos resultados

As amostras foram consideradas **positivas** quando houve presença de uma banda específica de 688 pb, definidos pelos *primers* utilizados e **negativas** quando houve ausência de banda específica.

4.5.2 Reação de PCR em tempo real para detecção do gene da glicoproteína C do VLTJ (qPCR LTI gC)

Foram selecionadas amostras positivas na reação de PCR convencional ICP4 às quais foram submetidas à reação de qPCR LTI gC, utilizando-se o kit comercial para a amplificação de DNA por PCR em tempo real QuantiNova Probe PCR (QIAGEN, Alemanha).

Os primers e sondas para a detecção de um produto do gene da glicoproteína C foram descritos por CALLISON, S. A. et al. (2007) e estão descritos no Quadro 5. Nesta reação, os primers e a sonda (marcador fluorescente) foram desenhados para amplificar um produto de 103 pb do gene que codifica para a glicoproteína C do envelope (gC) do VLTJ, sendo que a sonda foi marcada com o *reporter* FAM e o *quencher* BHQ1, além de incluir o ROX como referência passiva.

Quadro 5 - Primers e sondas utilizadas no ensaio de PCR em tempo real do gene da glicoproteína C do vírus de LTI

NOME	SEQUENCIA	PRODUTO
LTI gC – F	5' CCT TGC GTT TGA ATT TTT CTG T 3'	103 pb
LTI gC – R	5' TTC GTG GGT TAG AGG TCT GT 3'	
LTI gC	FAM-CAG CTC GGT GAC CCC ATT CTA-BHQ1	

Fonte: Callison (2007)

Em cada reação foram adicionados controles positivos e negativos (água livre de nucleases). A reação de qPCR utilizou 0,7 µL de água livre de nucleases, 10 µL do tampão (2X QuantiNova Probe PCR Master Mix), 0,1 µL de QN Rox Reference Dye (diluição 1:200), 0,4 µL do primer LTI gC-F (20 pmol/ µL), 0,4 µL do primer LTI gC (20 pmol/ µL), 0,4 µL da sonda LTI gC (10 pmol/ µL) e 8 µL da amostra, totalizando um volume final de 20 µL.

Foi utilizada a plataforma 7500 *Fast Real Time PCR System* (Applied Biosystems), cuja programação consistiu de 01 ciclo de 95°C por 2 minutos, 40

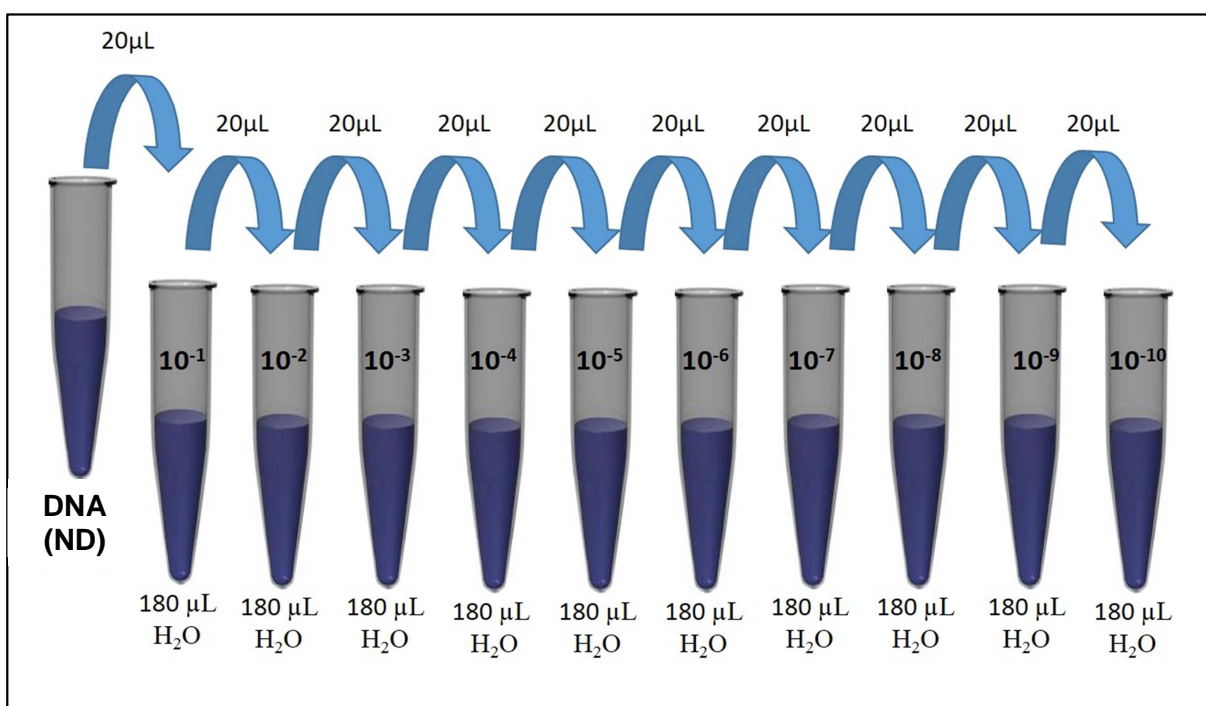
ciclos de 95°C por 5 segundos e 60°C por 32 segundos (coleta dos dados). A leitura e análise das reações foram realizadas através do programa *7500 Software* versão 2.3.

4.5.2.1 Curva padrão

A amostra de controle positivo do vírus de LTI foi submetida à extração automatizada de DNA, utilizando-se o kit de extração IndiMag Pathogen Kit (Indical BioScience) e o equipamento IndiMag 48, conforme descrito no item 4.2.2.

O DNA extraído foi diluído em série, na base 10 (de 10^{-1} a 10^{-10}), utilizando-se água livre de nucleases (Figura 17).

Figura 17 – Diluição em série para validação da técnica de qPCR LTI gC



Fonte: Luciano (2020).

Legenda: ND: não diluído.

O DNA proveniente da extração juntamente com as diluições seriadas foi submetido à reação de qPCR para LTI gC nas condições descritas no item 4.5.2.

Os parâmetros para a validação do ensaio foram estabelecidos:

- pelo menos um controle positivo deveria apresentar uma curva sigmoide (em forma de S) e um CT entre 25 a 29;

- o threshold deveria cruzar o meio da fase exponencial das curvas de amplificação dos controles positivos;
- os controles negativo deveriam ter CT indeterminado (não detectado);
- a curva padrão deveria apresentar eficiência de 90 a 100%, slope entre -3,3 e -3,5 e coeficiente de correlação (R2) maior que 0,99.

4.5.2.2 Limite de detecção

O limite de detecção foi considerado como a última diluição que apresentou um valor de CT detectado pelo equipamento.

4.5.2.3 Interpretação dos resultados

O threshold utilizado para as análises das amostras foi o mesmo obtido na curva padrão (3.5.2.1).

Para a validação do ensaio, pelo menos um controle positivo apresentou uma curva sigmoide (em forma de S) e o CT do controle negativo foi indeterminado (não detectado).

O controle negativo apresentou traços de fluorescência na linha de base durante todo o ensaio (40 ciclos), porém sem curva de amplificação. Amostras com CT abaixo de 40 foram consideradas **positivas**, amostras com CT indeterminado (não detectado) foram consideradas **negativas**.

4.6 SEQUENCIAMENTO POR SANGER

A partir dos resultados obtidos no qPCR, dezenove amostras positivas para o VLTI foram selecionadas para o sequenciamento parcial dos genes ICP4 e 10 para o sequenciamento parcial do gene TK.

O Quadro 6 descreve as sequencias de oligonucleotídeos utilizados no sequenciamento dos genes ICP4 e TK do VLTI.

Quadro 6 - Sequências dos oligonucleotídeos utilizados no sequenciamento dos genes ICP4 e TK do VLT1

NOME	SEQUÊNCIA	PRODUTO
ICP4 – F ¹	5' ACT GAT AGC TTT TCG TAC AGC ACG 3'	688 pb
ICP4 – R ¹	5' CAT CGG GAC ATT CTC CAG GTA GCA 3'	
TKIP ²	5' CTT AGC GGA ACC TATGCA AG 3'	783 pb
TK-R ²	5' GAG GCC ATG TGC TGG TAA GT 3'	

Fonte: ¹ CHACÓN, J. L.; FERREIRA (2009); ² COUTO et al. (2015)

Os ensaios de PCR para ICP4 e TK foram realizadas nas condições descritas no item 4.5.1. Os produtos amplificados foram purificados por meio de precipitação com polietilenoglicol (SCHMITZ; RIESNER, 2006). O sequenciamento foi realizado na Unidade Laboratorial de Referência (ULR) em Biologia Molecular Aplicada, do Instituto Biológico de São Paulo. Os amplicons foram submetidos à reação de sequenciamento pelo método de terminação de cadeia empregando-se o reagente Big Dye 3.1 (Applied Biosystems, EUA) e analisados em sequenciador capilar automático 3500 xL (Applied Biosystems, EUA).

4.7 SEQUENCIAMENTO DE ALTO DESEMPENHO (NGS)

4.7.1 Seleção de amostras

Foram selecionadas 16 amostras positivas para a reação de qPCR LTI gC_γ, mais o controle positivo, vacina CEO (Nobilis ILT - Intervet, Holanda), totalizando 17 amostras. Este conjunto de amostras foi submetido ao processo de preparação para o sequenciamento NGS. Antes, porém, foram fracionadas em duas alíquotas. A primeira alíquota foi submetida ao pré-tratamento, sendo identificadas com a legenda (T). A outra alíquota foi armazenada para ser, posteriormente, comparada no processo de quantificação do DNA, com a finalidade de verificar a eficiência do processo de pré-tratamento.

4.7.2 Pré-tratamento das amostras

As 17 amostras selecionadas anteriormente foram pré-tratadas e purificadas, de maneira independente, para evitar contaminação. Primeiramente, cada amostra foi tratada com 2U de RNase (Epicentre, EUA), incubando-se à 37°C por 30 minutos. Em seguida o DNA foi purificado com o AM Pure XP Beads (Beckman Coulter, EUA), com adição de 108 µL de beads em 60 µL do DNA. Após homogeneização e incubação a temperatura ambiente (TA) por 5 minutos, em estante magnética, o sobrenadante foi removido e ocorreu a lavagem das beads com 200 µL de etanol 80%, por duas vezes. As amostras foram retiradas da estante magnética e todo o excesso de etanol foi retirado cuidadosamente. As beads foram incubadas a 37°C por 4 minutos para permitir a evaporação completa do etanol das amostras. As amostras foram eluídas em 22,5 µL de água livre de nucleases e após a ressuspensão e homogeneização, o DNA foi recuperado após separação das beads, em estante magnética, sendo armazenados à -20°C até o momento do sequenciamento.

4.7.3 Quantificação do DNA das amostras

O DNA das amostras foi quantificado através do fluorímetro (Qubit 3, Thermo Fisher, EUA). Nesta etapa, foram quantificadas as 17 amostras submetidas ao processo de pré-tratamento (T) e as 17 amostras sem tratamento.

4.7.4 Preparo das bibliotecas para o NGS

A partir do DNA extraído das amostras, as bibliotecas foram preparadas com o kit Nextera DNA Flex Library Prep kit (Illumina, EUA) e marcadas com os adaptadores do Kit Nextera Flex index (Illumina, EUA). Em seguida, o tamanho das bibliotecas foi determinado no equipamento Agilent 2100 Bioanalyzer (Alemanha), utilizando-se o High Sensitivity DNA kit, conforme recomendado pelo fabricante. As bibliotecas foram quantificadas através da reação de qPCR, utilizando-se o KAPA Library Quantification kit – Universal qPCR Mix (KapaBiosystems, África do Sul). Com o resultado da quantificação, as bibliotecas foram diluídas de forma equimolar, agrupadas em um pool equimolar com concentração final de 4nM. A reação de sequenciamento foi realizada com o kit MiSeq Reagent, v.3 600, no equipamento MiSeq Illumina (Illumina, EUA), com leituras pareadas de 2x300pb. O

sequenciamento foi realizado no Laboratório NGS – ESALQ – USP, em Piracicaba – SP.

4.7.5 Montagem do genoma

As sequências foram obtidas com a análise no programa Geneious v.9.1.8 (Biomatters Limited). As leituras resultantes foram processadas, filtrando-se as leituras de baixa qualidade (8 bases com qualidades < 66), contaminadas com adaptador (com > 15 bp, correspondendo à sequência de adaptador), poli-Ns (com 8Ns), duplicação e leituras contaminadas com o genoma do hospedeiro utilizando o SOAP 3 (LIU, C. M. et al., 2012). As leituras filtradas foram mapeadas com sequências de referência disponíveis no banco de dados para estirpes de campo e vacinais do VLTI. As sequências no formato FASTQ foram mapeadas com sequências de referência disponíveis no banco de dados para o genoma completo de VLTI e os genes ICP4 e TK com os números de acesso do GenBank EU104909, DQ522947 e JN542534, respectivamente. Os contigs foram gerados a partir da sensibilidade média e após cinco interações com as sequências de referências. Para a obtenção do genoma completo, os contigs foram mapeados com o genoma viral após a montagem de novo. A sequência consenso foi gerada após a montagem dos contigs, utilizando a sequência concatenada de referência do VLTI depositada no GenBank (JN596962).

4.7.6 Análises Filogenéticas

As sequências de nucleotídeos obtidas foram manipuladas utilizando o programa Bioedit Sequence Alignment Editor versão 7.2.5 (HALL, 1999) e alinhadas usando-se o programa Clustal W (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994) no programa MEGA versão 7.0 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016). A similaridade das sequências comparada com sequências depositadas no GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome). O alinhamento dos genes ICP4 e TK foram então verificados manualmente. Os métodos para inferir as distâncias evolucionárias foram avaliados pelo programa TreeFinder. As árvores consensos foram inferidas para cada gene com 1000 réplicas (FELSENSTEIN, 1985) e foram utilizadas para

representar a evolução das sequências analisadas, sendo deduzidas utilizando o método *Maximum Likelihood* com *bootstrap* de 1000 réplicas. Para o genoma completo, árvores RaxML também foram construídas através do CIPRES Science Gateway utilizando os mesmos conjuntos de dados e parâmetros (DIMITROV et al., 2019).

5 RESULTADOS

5.1 AMOSTRAS

5.1.1 Influenza aviária e doença de Newcastle

Para o diagnóstico de IA e DNC foram coletadas 110 amostras de pools de suabes traqueais e 110 amostras de pools de suabes cloacais, a partir de 630 aves de subsistência de 81 propriedades.

Das 81 propriedades com aves de subsistência, 21 (25,9%) estavam localizadas próximas a incubatório de bisavós, 51 (63%) de incubatório de avós e 09 (11,1%) de avozeiro. A maior parte da amostragem de aves (381/630) foi proveniente do município de Nova Granada, onde se localiza o incubatório de avós, correspondendo a 60,5% do total. Em Palestina, 176 aves (27,9%) foram coletadas (próximas ao incubatório de bisavós) e em Guapiaçu, 73 aves (próximas ao avozeiro), correspondendo a 11,6%.

Das 110 amostras de pool de suabe traqueal e 110 de suabe cloacal, 58 (52,7%) foram coletadas em Nova Granada, 37 amostras (33,6%) em Palestina e 15 amostras (13,7%) em Guapiaçu. Deste total, 102 (92,8%) amostras foram coletadas de galinhas, 03 (2,7%) de patos, 02 (1,8%) de gansos, 02 (1,8%) de codornas e 01 (0,9%) de peru, conforme a Tabela 5. As galinhas corresponderam a 96,2% das aves analisadas neste estudo.

Tabela 5 – Amostragem coletada por espécie e número de aves

ESPÉCIE	Nº POOLS DE SUABES TRAQUEAIS (ST)	Nº POOLS DE SUABES CLOACAIS (SC)	% SUABES	Nº AVES COLETADAS	% AVES COLETADAS
Galinha	102	102	92,8	606	96,2
Pato	03	03	2,7	10	1,6
Codorna	02	02	1,8	10	1,6
Ganso	02	02	1,8	03	0,5
Peru	01	01	0,9	01	0,1
TOTAL	110	110	100	630	100

Fonte: Luciano (2020).

5.1.2 Laringotraqueíte infecciosa das galinhas

Para o diagnóstico de LTI foram analisados 578 lotes de granjas de postura comercial, totalizando 3578 amostras de pools de suabes traqueais (de 3 a 10 pools/amostra), coletadas de 14700 aves, em duas regiões: bolsão de Bastos e Guatapar (Tabela 4).

A amostragem para o diagnóstico de LTI foi composta de 214 lotes de amostras (37%) provenientes da região de Guatapar e 364 lotes de amostras (63%) coletadas no bolsão de Bastos.

5.2 DIAGNÓSTICO MOLECULAR PARA DETECO DO GENE M DO VIA – RRT-PCR IA

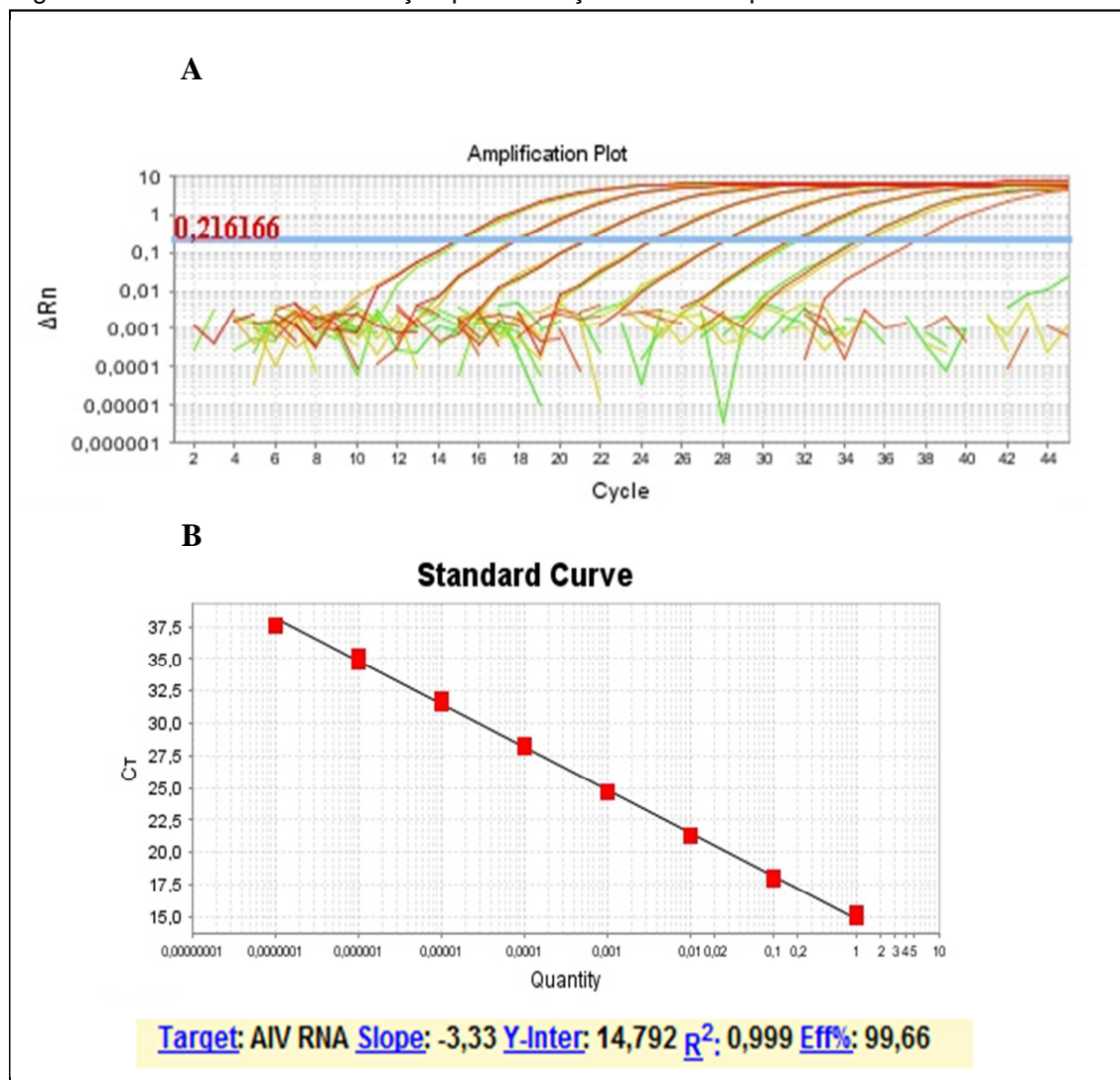
5.2.1 Validao da técnica de RRT-PCR IA

5.2.1.1 Curva padrão

O threshold foi de 0,216166 e os valores de CT obtidos na curva padrão para a reao de RRT-PCR de IA estão ilustrados na Figura 18 (A). A eficiência da

reação foi de 99,66%, o slope -3,33, o coeficiente de correlação (R^2) foi de 0,999 e o ponto de intersecção no eixo Y foi de 14,792 (Figura 18 B).

Figura 18 – Parâmetros da validação para a reação RRT-PCR para IA



Fonte: Luciano (2020).

Legenda: A) Amplificação da curva padrão e a fluorescência; B) Detecção por quantificação da curva padrão em cada C_t para calcular os dados qualitativos de eficiência da reação.

O limite de detecção desta técnica foi de 8 cópias de RNA (diluição de 10^{-7}), com C_t de 37,59, nas condições em que foi conduzido este experimento (Tabela 6). A média dos C_t 's referentes aos controles positivos foi de 26,59, equivalendo a aproximadamente a 8000 cópias de RNA.

Tabela 6 – Limite de detecção da técnica de RRT-PCR para IA

Diluição do RNA A/TY/MN/3689-1551/81 (H5N2)	Nº cópias RNA	CT
10⁻⁰	80000000	15,06
10⁻¹	8000000	17,91
10⁻²	800000	21,28
10⁻³	80000	24,67
10⁻⁴	8000	28,18
10⁻⁵	800	31,63
10⁻⁶	80	34,92
10⁻⁷	8	37,59
10⁻⁸	ND	Indeterminado
10⁻⁹	ND	Indeterminado
10⁻¹⁰	ND	Indeterminado
CP	8000	26,59

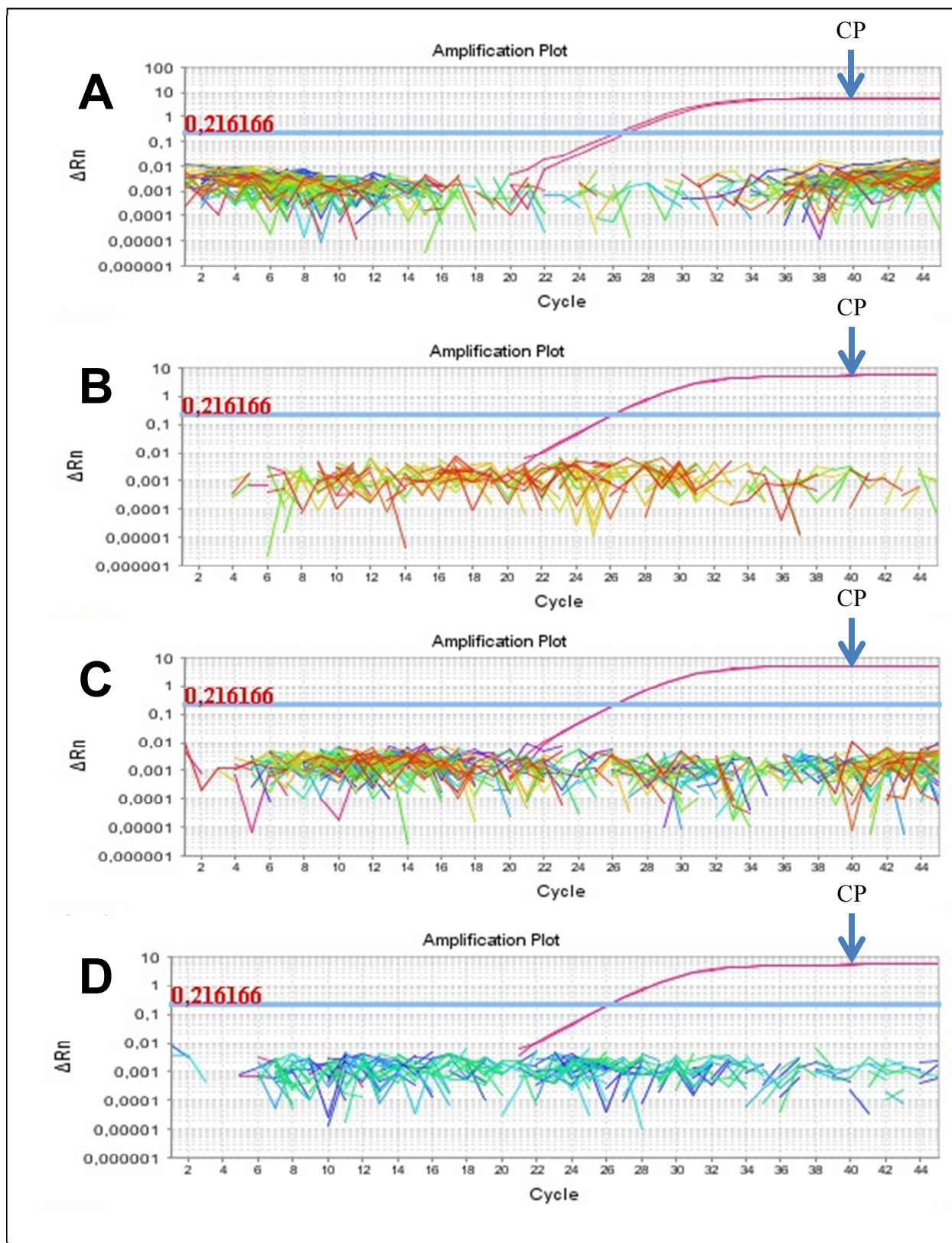
Legenda: ND – não detectado; CP – controle positivo (Influenza Virus-Xeno™ RNA Control Mix); CT – ciclo Threshold

Fonte: Luciano (2020).

5.2.1.2 Análise dos resultados de RRT-PCR IA

Não houve detecção de nenhuma amostra positiva (Figura 19) das 110 amostras de pools de suabes traqueais e 110 amostras de pools de suabes cloacais analisadas.

Figura 19– Resultados obtidos da prova de RRT-PCR para IA, a partir de pools de amostras de suabe traqueais e cloacais em aves de subsistência



Fonte: Luciano (2020).

Legenda: A – Amostras de suabe traqueal (1-75); B- Amostras de suabe traqueal (76-110); C- Amostras de suabe cloacal (1-75); D- Amostras de suabe cloacal (76-110) CP – controle positivo VIA.

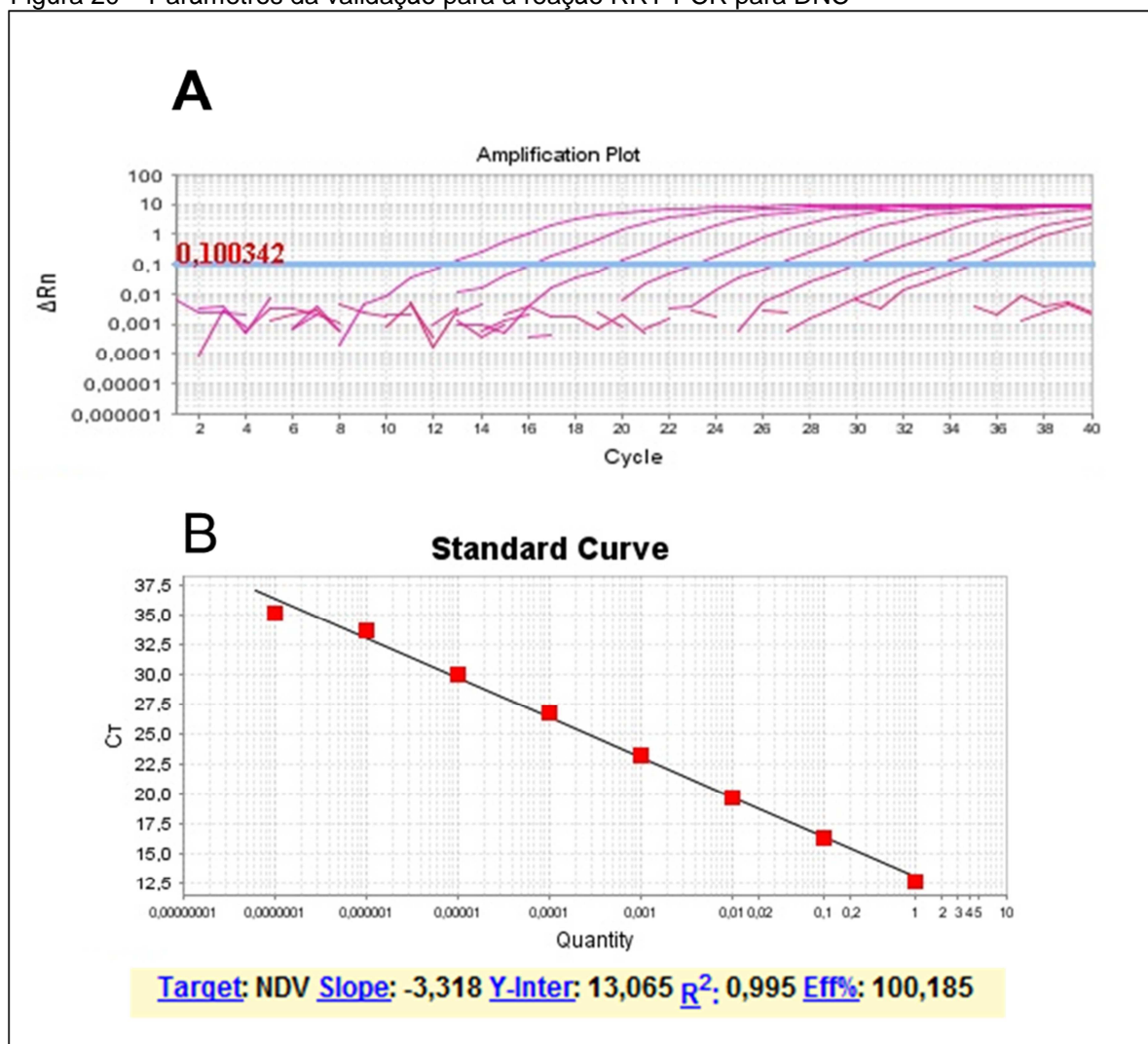
5.3 DIAGNÓSTICO MOLECULAR PARA DETECÇÃO DO GENE M DO VDNC

5.3.1 Validação da técnica de RRT-PCR para DNC

5.3.1.1 Curva padrão

O threshold foi de 0,100342 e os valores de CT obtidos na curva padrão para a reação de RRT-PCR de DNC estão ilustrados na Figura 20A. A eficiência da reação foi de 100,19%, o slope -3,318, o coeficiente de correlação (R^2) foi de 0,995 e o ponto de intersecção no eixo Y foi de 13,065 (Figura 20B).

Figura 20 – Parâmetros da validação para a reação RRT-PCR para DNC



Fonte: Luciano (2020)

Legenda: A) Amplificação da curva padrão e a fluorescência; B) Detecção por quantificação da curva padrão em cada CT para calcular os dados qualitativos de eficiência da reação.

5.3.1.2 Limite de detecção

O limite de detecção desta técnica foi de até $10^{1,2}$ DIE₅₀/mL (diluição de 10^{-8}), com CT de 35,17, nas condições em que conduzido este experimento (Tabela 7). O controle positivo a ser utilizado nas reações de RRT-PCR para DNC foi obtido na diluição de 10^{-5} (CT de 26,68).

Tabela 7 – Limite de detecção da técnica de RRT-PCR para DNC

Diluição do RNA	Título Viral	CT
Cepa vacinal La Sota	(DIE₅₀/mL)	
10^{-0}	$10^{8,2}$	12,62
10^{-1}	$10^{7,2}$	16,33
10^{-2}	$10^{6,2}$	19,72
10^{-3}	$10^{5,2}$	23,27
10^{-4}	$10^{4,2}$	26,68
10^{-5}	$10^{3,2}$	29,95
10^{-6}	$10^{2,2}$	33,67
10^{-7}	$10^{1,2}$	35,17
10^{-8}	ND	Indeterminado
10^{-9}	ND	Indeterminado
10^{-10}	ND	Indeterminado

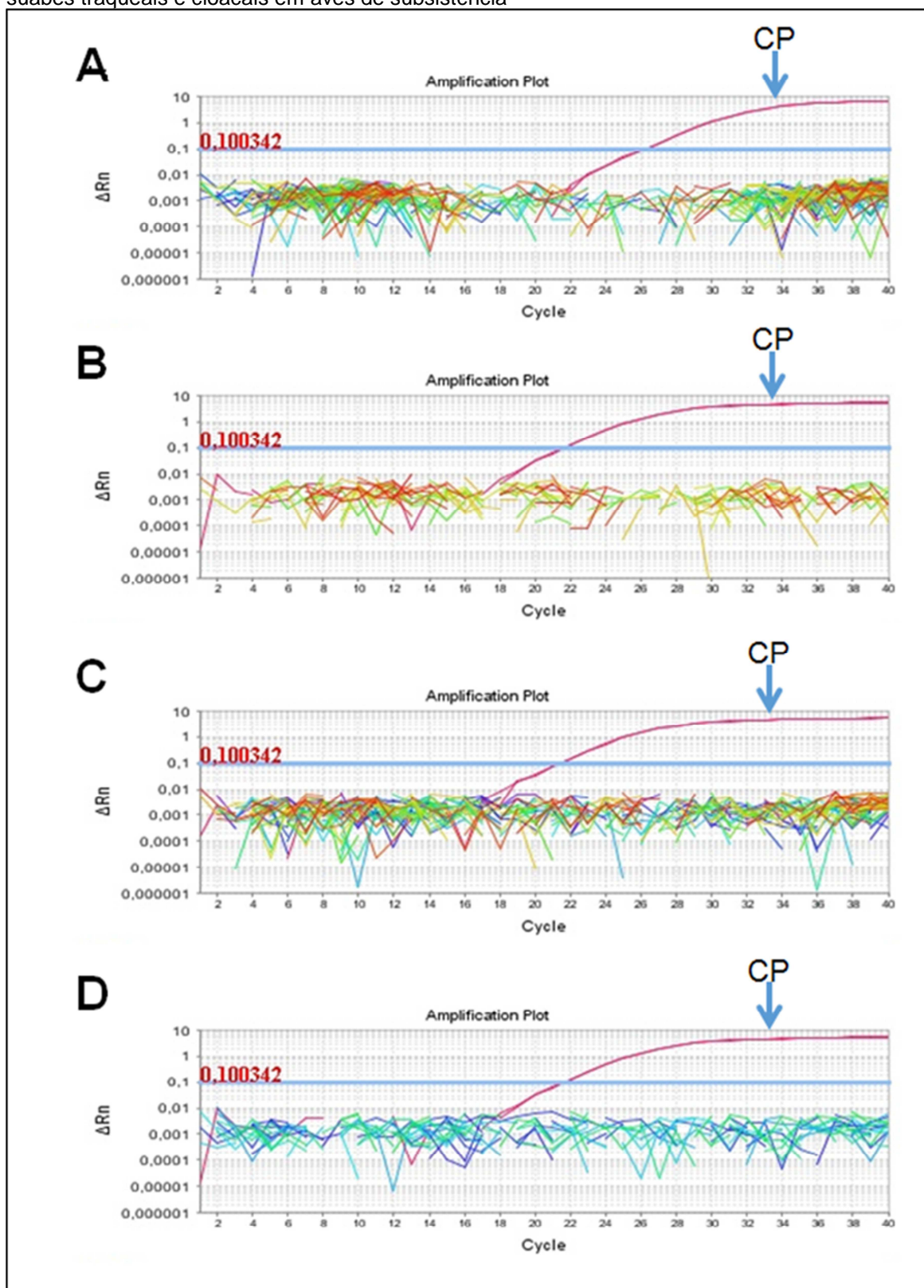
Fonte: Luciano (2020).

Legenda: ND – não detectado; CT – ciclo Threshold.

5.3.1.3 Análise dos resultados de RRT-PCR para DNC

Não houve detecção de nenhuma amostra positiva (Figura 21) das 110 amostras de pools de suabes traqueais e 110 amostras de pools de suabes cloacais analisadas.

Figura 21 – Resultados obtidos da prova de RRT-PCR para DNC, a partir de pools de amostras de suabes traqueais e cloacais em aves de subsistência



Fonte: Luciano (2020).

Legenda: A – Amostras de suabe traqueal (1-75); B- Amostras de suabe traqueal (76-110); C- Amostras de suabe cloacal (1-75); D- Amostras de suabe cloacal (76-110) CP – controle positivo VDNC.

5.4 DIAGNÓSTICO MOLECULAR PARA DETECÇÃO DO VLTI

5.4.1 PCR – LTI – ICP4

5.4.1.1 Validação da técnica

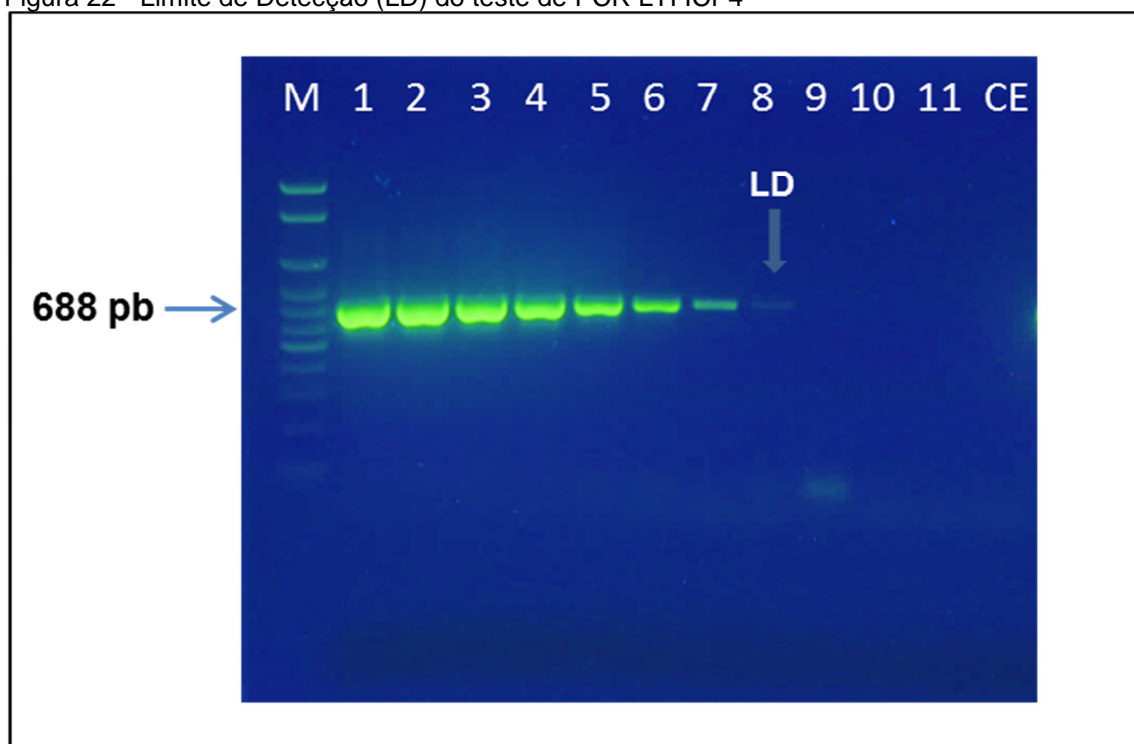
Para a validação da técnica, foi utilizado o antígeno comercial utilizado para o teste de Imunodifusão de Ágar Gel para LTI (Charles River, EUA). Uma alíquota de 200 μL desta vacina foi submetida à extração magnética de DNA, nas condições descritas no item 4.2.2. O DNA foi eluído em 100 μL de Tampão AVE (fornecido pelo kit de extração).

5.4.1.2 Limite de detecção

Foram realizadas diluições seriadas, na base 5 (de 1:5 a 1:1953125), utilizando-se água livre de nucleases. O DNA extraído (com concentração de 7954 $\text{pg}/\mu\text{L}$), juntamente com as diluições seriadas, foi submetido à reação de PCR LTI ICP4, segundo os parâmetros descritos no item 4.5.1.

De acordo com a revelação do gel de eletroforese, o limite de detecção da técnica foi de 1:78125, ou seja, 0,1 $\text{pg}/\mu\text{L}$ (Figura 22 e Tabela 8).

Figura 22 - Limite de Detecção (LD) do teste de PCR LTI ICP4



Fonte: Luciano (2020).

Legenda: Canaletas: **M**) marcador de peso molecular de 100bp; **1**) DNA extraído sem diluir; **2**) diluição 1:5; **3**) diluição 1:25; **4**) diluição 1:125; **5**) diluição 1:625; **6**) diluição 1:3125; **7**) diluição 1:15625; **8**) diluição 1:78125; **9**) diluição 1:390625; **10**) diluição 1:1953215; **11**) 1:97665625; **CE**) controle negativo de extração

Tabela 8 – Conversão das diluições seriadas de base 5 para o exponencial na potência 10, no LD do teste de PCR LTI ICP4

CANALETA	Diluição do CP (base 5)	Valor do CP (potência de 10)	Concentração (pg/μL)	Resultado
1	sem diluir	1	7954,0	Positivo
2	1:5	$10^{-0.7}$	1590,8	Positivo
3	1:25	$10^{-1.4}$	318,1	Positivo
4	1:125	$10^{-2.1}$	63,6	Positivo
5	1:625	$10^{-2.8}$	12,7	Positivo
6	1:3125	$10^{-3.5}$	2,5	Positivo
7	1:15625	$10^{-4.2}$	0,5	Positivo
8	1:78125	$10^{-4.9}$	0,1	Positivo
9	1:390625	$10^{-5.6}$	0,0204	Negativo
10	1:1953125	$10^{-6.3}$	0,0041	Negativo
11	1:9765625	10^{-7}	0,0008	Negativo

Fonte: Luciano (2020).

Legenda: CP – controle positivo.

5.4.2 qPCR LTI gC

5.4.2.1 Validação da técnica

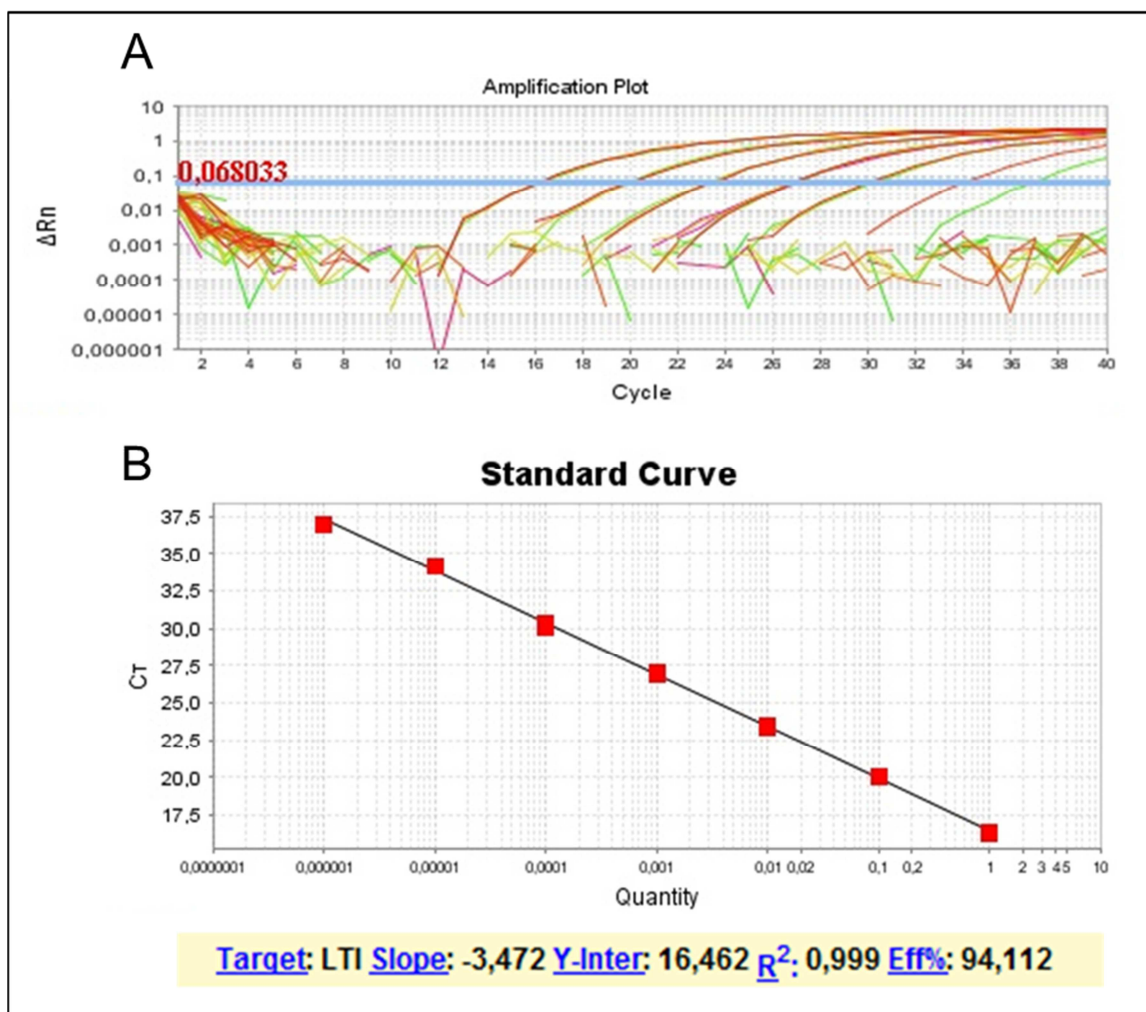
Para a validação da técnica, foi utilizado o antígeno comercial utilizado para o teste de Imunodifusão de Ágar Gel para LTI (Charles River, EUA). Uma alíquota de 200 µL deste antígeno foi submetida à extração magnética de DNA, nas condições descritas no item 4.2.2. O DNA foi eluído em 100 µL de Tampão AVE (fornecido pelo kit de extração).

5.4.2.2 Curva padrão

Foram realizadas diluições seriadas, na base 10 (de 10^{-1} a 10^{-10}), utilizando-se água livre de nucleases. O DNA extraído (sem diluição), juntamente com as diluições seriadas foram submetidos à reação de RRT-PCR, segundo os parâmetros descritos no item 4.5.2.

O threshold foi de 0,068033 e os valores de CT obtidos na curva padrão para a reação de q-PCR LTI gC estão ilustrados na Figura 23 (A). A eficiência da reação foi de 94,112, o slope -3,472, o coeficiente de correlação (R^2) foi de 0,999 e o ponto de intersecção no eixo Y foi de 16,462 (Figura 23 B).

Figura 23 – Parâmetros da validação para a reação qPCR LTI gC



Fonte: Luciano (2020).

Legenda: A) Curva padrão; B) Cálculos da eficiência da reação.

5.4.2.3 Limite de detecção

O limite de detecção desta técnica foi de 0,0079540 pg/ μ L, detectado na diluição 10^{-6} , que obteve CT de 36,97 nas condições em que este experimento foi conduzido (Tabela 9).

Tabela 9 – Limite de detecção da técnica de qPCR gC para LTI

Diluição da cepa Cover do VLTI	Concentração (pg/μL)	CT	Resultado
10^0	7954	16,29	POSITIVO
10^{-1}	7,954	20,04	POSITIVO
10^{-2}	79,54	23,49	POSITIVO
10^{-3}	7,954	26,98	POSITIVO
10^{-4}	0,7954	30,21	POSITIVO
10^{-5}	0,07954	34,18	POSITIVO
10^{-6}	0,0079540	36,97	POSITIVO
10^{-7}	0,0007954	ND	NEGATIVO
10^{-8}	0,0000795	ND	NEGATIVO
10^{-9}	0,0000079	ND	NEGATIVO
10^{-10}	0,0000007	ND	NEGATIVO

Fonte: Luciano (2020).

Legenda: ND – não detectado; CT – ciclo Threshold.

5.4.3 Análise dos resultados do diagnóstico molecular do VLTI

5.4.3.1 PCR – LTI – ICP4

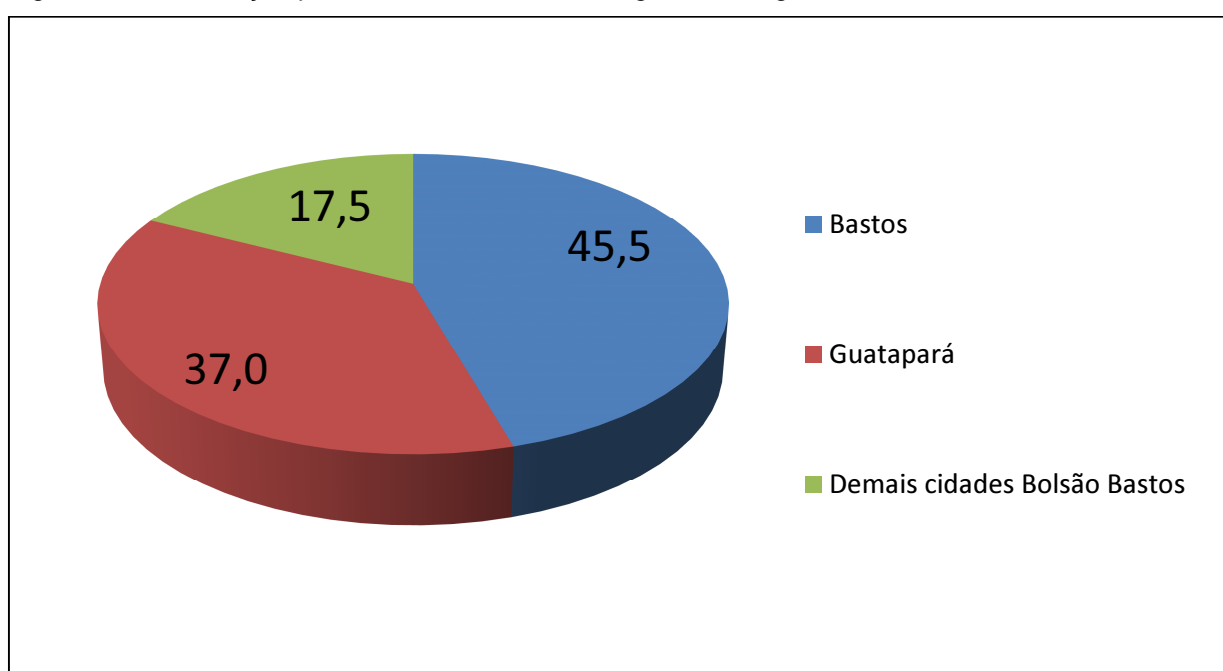
Do total de amostras analisadas, a maioria foi coletada no bolsão de Bastos, equivalendo a 63% (364/578). Destas, 263 amostras foram coletadas em Bastos (45,5%) e 101 (17,5%) em outros onze municípios da região. Em Guatapar, foram coletadas 37% das amostras (214/578), segundo a Tabela 10 e a Figura 24.

Tabela 10 – Percentual de amostras por cidade, submetidas ao PCR LTI ICP4

Regiões	Cidade	Nº Lotes	Percentual (%)	Nº aves
GUATAPARÁ	Guatapará	214	37,0	6260
	Bastos	263	45,5	6080
	Herculândia	14	2,4	265
	Iacri	11	1,9	265
	João Ramalho	1	0,2	15
	Lucélia	1	0,2	30
	Oswaldo Cruz	11	1,9	245
	Parapuã	12	2,0	285
	Queiroz	15	2,6	375
	Quintana	4	0,7	240
	Rancharia	7	1,2	105
	Rinópolis	1	0,2	25
	Tupã	24	4,2	510
TOTAL		578	100,00	14700

Fonte: Luciano (2020).

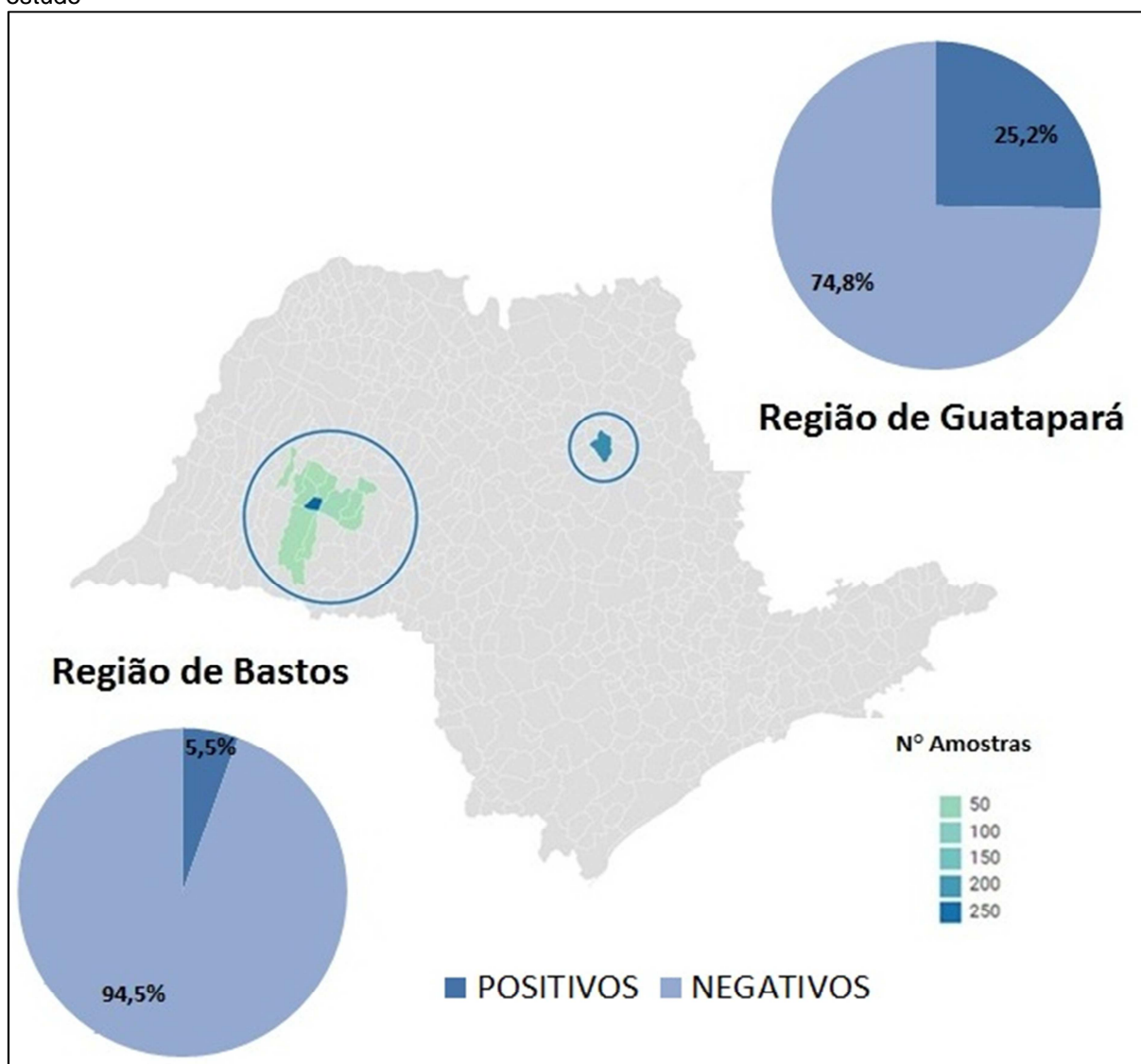
Figura 24 – Distribuição percentual das amostras, segundo as regiões estudadas



Fonte: Luciano (2020).

A maior taxa de detecção (25,2%) ocorreu em Guatapar com 54 lotes positivos entre os 214 testados. O bolsão de Bastos apresentou uma baixa taxa de detecção (5,5%) com apenas 20 amostras entre as 364 amostras testadas. As amostras positivas foram detectadas apenas no Município de Bastos (n=5), Iacri (n=1) e Queiroz (n=14, segundo demonstra a Figura 25).

Figura 25 - Taxa de detecção do VLTI através do PCR LTI ICP4 nas duas regiões amostradas neste estudo



Fonte: Luciano, R.L (2020).

A maior taxa de detecção na região do bolsão de Bastos foi de 12,6% (14/111), em 2018, seguido de 11,8% (6/51) em 2013. Em 2010, não houve coleta nesta região, enquanto que nos demais anos não houve detecção do VLTI através da técnica de PCR LTI ICP4 (Tabela 11 e Figura 26A).

A maior taxa de detecção de LTI ocorreu em Guatapar, em 2010, com 60,5% de lotes positivos (23/38). Não ocorreram coletas em Guatapar em 2012 e anos de 2014 e 2015, devido ao fato de que houve notificação de doença respiratória na região, sendo que foi adotada a vigilância passiva, com coleta e remessa de material para diagnóstico para o laboratório federal (LFDA/SP), localizado em Campinas – SP. As amostras utilizadas neste estudo foram coletadas pelo serviço oficial através da vigilância ativa (Tabela 11 e Figura 26B).

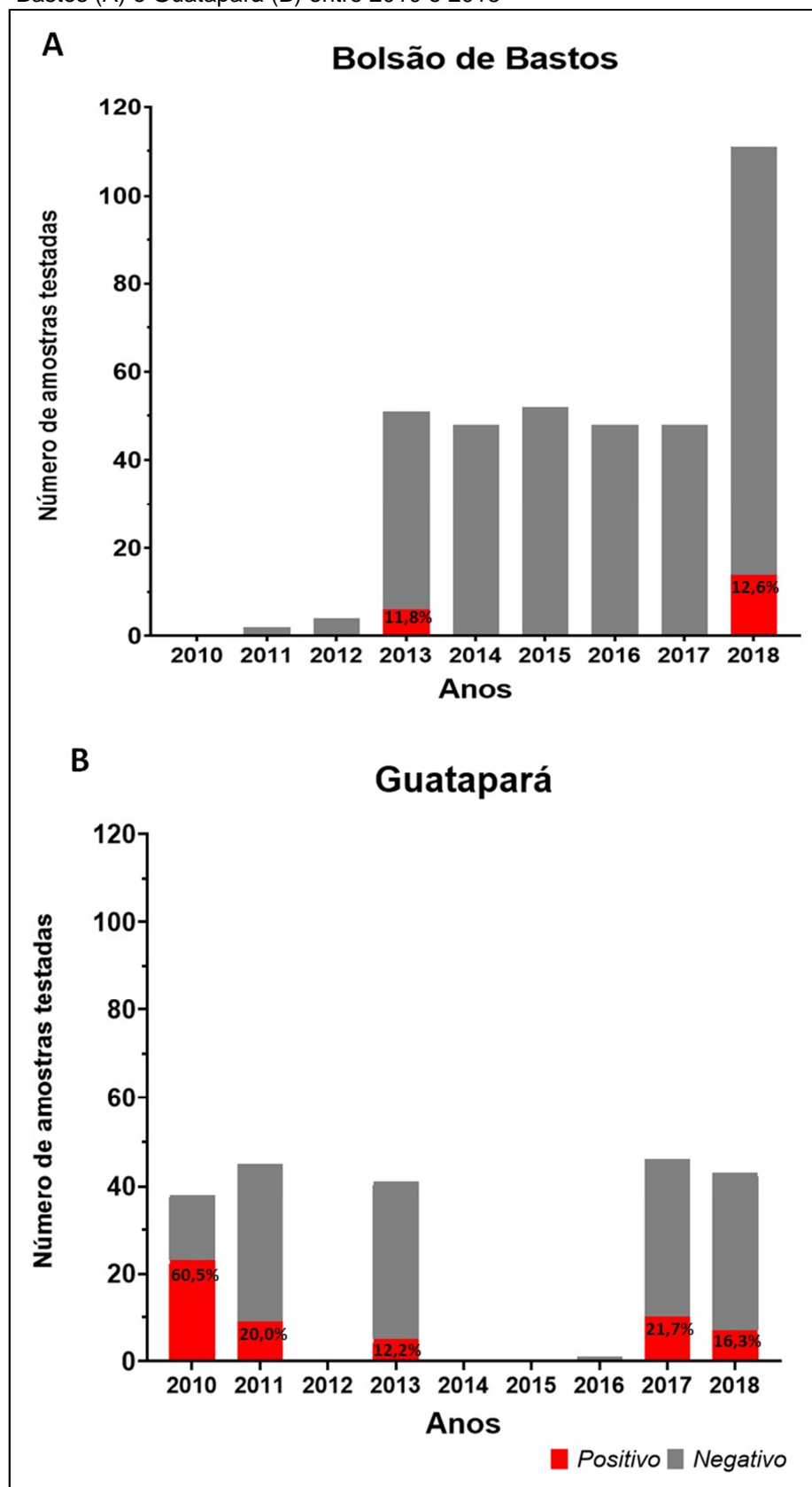
Tabela 11 – Detecção do VLTi através do PCR LTI ICP4, detalhamento por ano e região analisada

ANO	LOCAL	Não Lotes	PCR LTI			
			POS	%	NEG	%
2010	BB	CNR	NA	NA	NA	NA
	GUA	38	23	60,5	15	39,5
2011	BB	2	0	0	2	100
	GUA	45	9	20	36	80
2012	BB	4	0	0	4	100
	GUA	CNR	NA	NA	NA	NA
2013	BB	51	6	11,8	45	88,2
	GUA	41	5	12,2	36	87,8
2014	BB	48	0	0	48	100
	GUA	CNR	NA	NA	NA	NA
2015	BB	52	0	0	52	100
	GUA	CNR	NA	NA	NA	NA
2016	BB	48	0	0	48	100
	GUA	1	0	0	1	100
2017	BB	48	0	0	48	100
	GUA	46	10	21,7	36	78,3
2018	BB	111	14	12,6	97	87,4
	GUA	43	7	16,3	36	83,7
TOTAL		578	74	12,8	504	87,20

Fonte: Luciano (2020).

Legenda: BB – bolsão de Bastos; GUA – Guatapar; POS – positivos; NEG – negativos; CNR – coleta não realizada; NA – não se aplica.

Figura 26 – Dinâmica do número de amostras testadas e percentual de positivos de VLTI detectados pela técnica de PCR LTI ICP4, no bolsão de Bastos (A) e Guatapar (B) entre 2010 e 2018



Fonte: Luciano (2020).

Em 14,5% dos lotes avaliados (84/578) não foi informada a idade das aves, sendo todos provenientes de Guatapar. Dos 494 lotes restantes, a faixa de idade variou de 8 a 130 semanas (Tabela 12).

Tabela 12 – Distribuição das amostras submetidas ao diagnóstico do VLTI, através do PCR LTI ICP4, segundo a idade

FASE	IDADE (SEM.)	N° LOTES	BOLSÃO DE BASTOS				GUATAPARÁ			
			POS	%	NEG	%	POS	%	NEG	%
CRIA	ATÉ 6	CNR	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
RECRIA	7 – 17	33	0	0	5	100	7	25,0	21	75,0
POSTURA	18 – FINAL CICLO	461	20	5,6	339	94,4	31	30,4	71	69,6
NI	NI	84	0	0	0	0	16	19,0	68	81,0
TOTAL		578	20	5,5	344	94,5	54	25,2	160	74,8

Fonte: Luciano (2020).

Legenda: NI – não informado; CNR – coleta não realizada; NA – não se aplica.

A maior amostragem foi realizada em aves na fase de postura, correspondendo a quase 80% das amostras coletadas. No bolsão de Bastos, houve uma taxa de detecção do VLTI de 5,6% (20/359) na fase postura e nenhuma amostra positiva na recria. Em Guatapar, a maior taxa de detecção do VLTI foi 30,4% (31/102) na fase de postura, sendo que a recria apresentou uma taxa de detecção de 25% (7/28).

5.4.3.2 qPCR LTI gC

As amostras positivas no PCR LTI ICP4 foram submetidas ao qPCR LTI gC para seleção de amostras a serem submetidas ao sequenciamento pelo método de Sanger e NGS. Foram selecionadas 15 amostras, com CT's entre 22,01 e 36,87, para sequenciamento parcial do gene ICP4 do VLTI e, dessas, 10 amostras para o sequenciamento parcial do gene TK, através do método de Sanger. Também foram escolhidas 16 amostras para o NGS, com CT's entre 23,38 e 27,68 mais um controle positivo, vacina CEO – Nobilis – ILT (Intervet, Holanda).

5.5 SEQUENCIAMENTO POR SANGER

No bolsão de Bastos, não houve coleta em Bastos (2010) e não houve amostras positivas para o VLTI nos anos de 2011, 2012, 2014, 2015, 2016 e 2017. Então, foram sequenciadas 2 amostras, provenientes de Iacri e Bastos (2013) e 2 amostras, provenientes de Queiroz (2018). Das amostras provenientes de Guatapar, foram sequenciadas 2 amostras (2010), e 2 amostras (2011), 1 amostra (2013), 4 amostras (2017) e 2 amostras (2018). Não houve coleta em Guatapar em 2012, 2014 e 2015 e não houve amostras positivas para o VLTI em 2016. Das 15 amostras positivas para o gene ICP4, apenas 10 foram positivas no PCR LTI TK (Tabela 13 e Figura 27).

Tabela 13 – Relação de amostras selecionadas para sequenciamento parcial dos genes ICP4 e TK do VLTI

Amostra	Coleta	Idade (sem)	Vacinação	CT qPCR LTI gC	Sequenciamento ICP4/TK
ILTV/chicken/Brazil(Guatapara-SP)/IB8089/2010	03/12/2010	NI	NV	23,13	ICP4/TK
ILTV/chicken/Brazil(Guatapara-SP)/IB8098/2010	03/12/2010	15	NV	25,45	ICP4/TK
ILTV/chicken/Brazil(Guatapara-SP)/IB35471/2011	21/11/2011	78	TCO	25,25	ICP4/TK
ILTV/chicken/Brazil(Guatapara-SP)/IB35494/2011	21/11/2011	64	TCO	26,17	ICP4/TK
ILTV/chicken/Brazil(Guatapara-SP)/IB27617/2013	19/03/2013	23	TCO	27,37	ICP4/TK
ILTV/chicken/Brazil(Iacri-SP)/IB5367/2013	17/06/2013	60	Recomb	36,68	ICP4
ILTV/chicken/Brazil(Bastos-SP)/IB5370/2013	17/06/2013	80	Recomb	36,87	ICP4
ILTV/chicken/Brazil(Guatapara-SP)/IB1970/2017	21/01/2017	30	Recomb	30,07	ICP4/TK
ILTV/chicken/Brazil(Guatapara-SP)/IB1252-18/2017	11/07/2017	NI	Recomb	30,94	ICP4/TK
ILTV/chicken/Brazil(Guatapara-SP)/IB1262-18/2017	11/07/2017	NI	Recomb	25,26	ICP4
ILTV/chicken/Brazil(Guatapara-SP)/IB1271-18/2017	11/07/2017	NI	Recomb	30,57	ICP4/TK
ILTV/chicken/Brazil(Queiroz-SP)/IB12125/2018	30/05/2018	84	Recomb	35,77	ICP4
ILTV/chicken/Brazil(Queiroz-SP)/IB12137/2018	30/05/2018	38	Recomb	34,79	ICP4
ILTV/chicken/Brazil(Guatapara-SP)/IB17236/2018	24/07/2018	NI	Recomb	22,01	ICP4/TK
ILTV/chicken/Brazil(Guatapara-SP)/IB30498/2018	27/11/2018	NI	Recomb	22,33	ICP4/TK

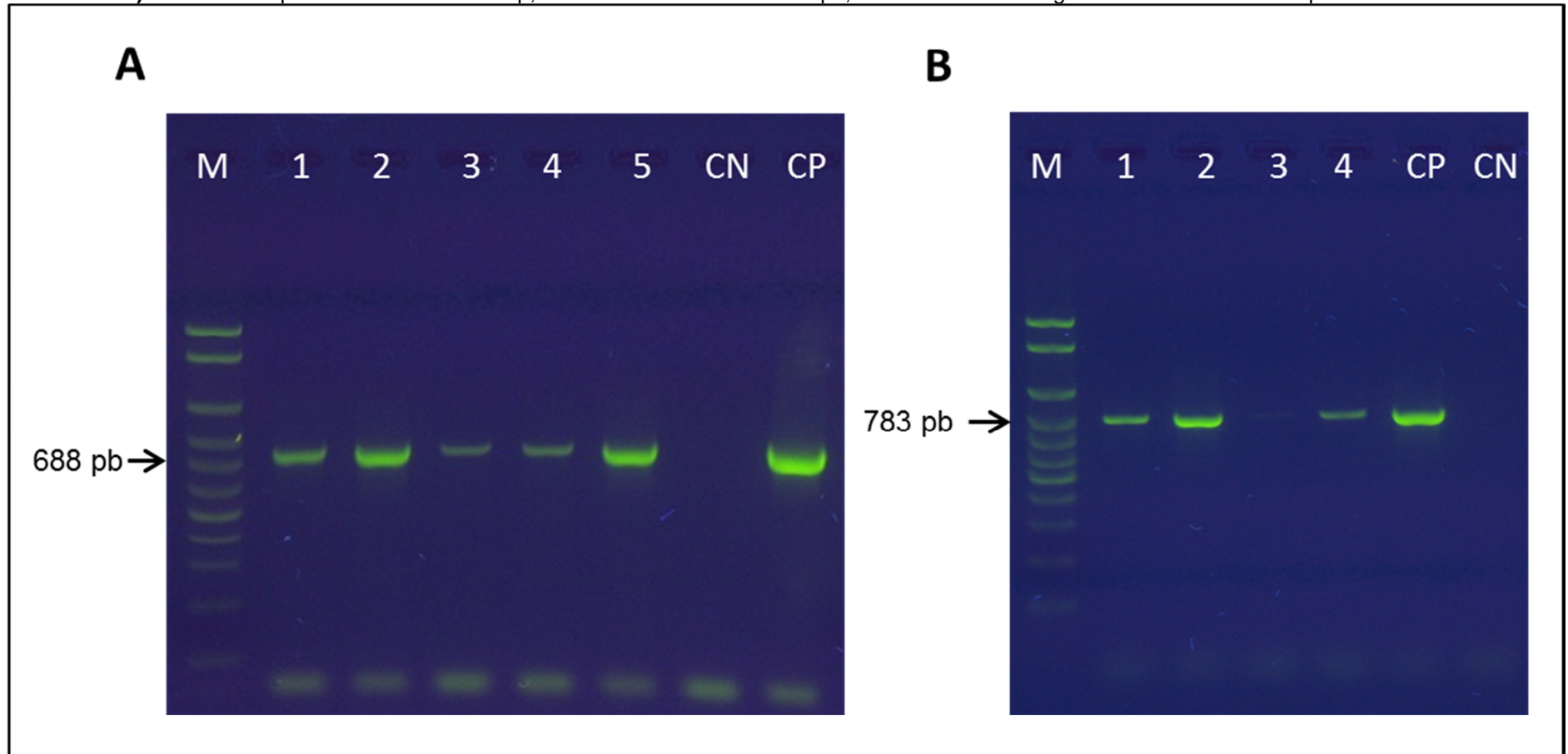
Legenda: NV – não vacinada / TCO – vacina de cultivo celular / Recomb – vacina recombinante. As amostras do bolsão de Bastos foram destacadas em negrito e as amostras de Guatapar em fonte azul.

Fonte: Luciano (2020).

Figura 27 – Resultados das eletroforeses em gel de agarose das reações de PCR LTI para sequenciamento pelo método tradicional de Sanger

A) PCR LTI ICP4 e B) PCR LTI TK

Canaletas: **M)** marcador de peso molecular de 100bp; **1-5 e 8-11** amostras de campo; 6 e 13 – controle negativo e 7 e 12 – controle positivo



Fonte: Luciano (2020).

Legenda: M – marcador de peso molecular; CN – controle negativo; CP – controle positivo.

A) PCR LTI ICP4 – Canaletas de 1-5: amostras de campo; B) PCR LTI TK – Canaletas de 1-4: amostras de campo.

5.6 SEQUENCIAMENTO NGS

5.6.1 Seleção de amostras e quantificação do DNA

Das 17 amostras selecionadas, pré-tratadas e purificadas (T), 12 foram submetidas ao sequenciamento NGS, além do controle positivo – CP (vacina CEO, Nobilis ILT – Intervet, Holanda), totalizando 13 amostras. Após a análise dos resultados obtidos na quantificação, 4 amostras purificadas (IB8080, IB8083, IB8089 e IB8094) foram descartadas por apresentarem valores abaixo de 0,2 ng/μL (concentração mínima recomendada para a construção das bibliotecas).

Das amostras selecionadas, a IB30498 apresentou concentração de 0,195 ng/μL (concentração próxima ao mínimo recomendado), 03 não foram previamente purificadas (NT) (IB8083, IB8098 e IB30498) e as demais foram amostras submetidas ao pré-tratamento (T) (IB8088, IB8096, IB8104, IB35494, IB1262-18, IB17221, IB17222, IB17235, IB17236 e o controle positivo CP) – Tabela 14.

Tabela 14 – Relação de amostras selecionadas para o sequenciamento NGS

Amostra	Coleta	Idade (sem)	Vacinação	CT qPCR LTI gC	Conc ng/μL	A260/ A280
ILTV/chicken/Brazil(Guatapara-SP)/IB8083/2010 ^{NT}	03/12/2010	31	NV	27,4	0,207	4,34
ILTV/chicken/Brazil(Guatapara-SP)/IB8088/2010 ^T	03/12/2010	NI	NV	26,01	0,258	-7,6
ILTV/chicken/Brazil(Guatapara-SP)/IB8096/2010 ^T	03/12/2010	08	NV	23,58	0,232	3,00
ILTV/chicken/Brazil(Guatapara-SP)/IB8098/2010 ^{NT}	03/12/2010	15	NV	26,43	0,616	3,98
ILTV/chicken/Brazil(Guatapara-SP)/IB8104/2010 ^T	03/12/2010	23	NV	26,14	0,218	2,25
ILTV/chicken/Brazil(Guatapara-SP)/IB35494/2011 ^T	12/12/2011	64	TCO	27,56	3,380	1,89
ILTV/chicken/Brazil(Guatapara-SP)/IB1262-18/2017 ^T	11/07/2017	NI	RECOMB	27,68	1,920	1,95
ILTV/chicken/Brazil(Guatapara-SP)/IB17221/2018 ^T	30/07/2018	NI	RECOMB	27,15	0,336	1,39
ILTV/chicken/Brazil(Guatapara-SP)/IB17222/2018 ^T	30/07/2018	NI	RECOMB	24,72	0,352	2,16
ILTV/chicken/Brazil(Guatapara-SP)/IB17235/2018 ^T	30/07/2018	NI	RECOMB	27,42	2,290	2,04
ILTV/chicken/Brazil(Guatapara-SP)/IB17236/2018 ^T	30/07/2018	NI	RECOMB	23,38	1,180	2,87
ILTV/chicken/Brazil(Guatapara-SP)/IB30498/2018 ^{NT}	11/12/2018	NI	RECOMB	24,23	0,195	3,23
CP – Vacina CEO Nobilis ILT – Intervet – Estirpe Serva	-	-	-	-	44,6	1,84

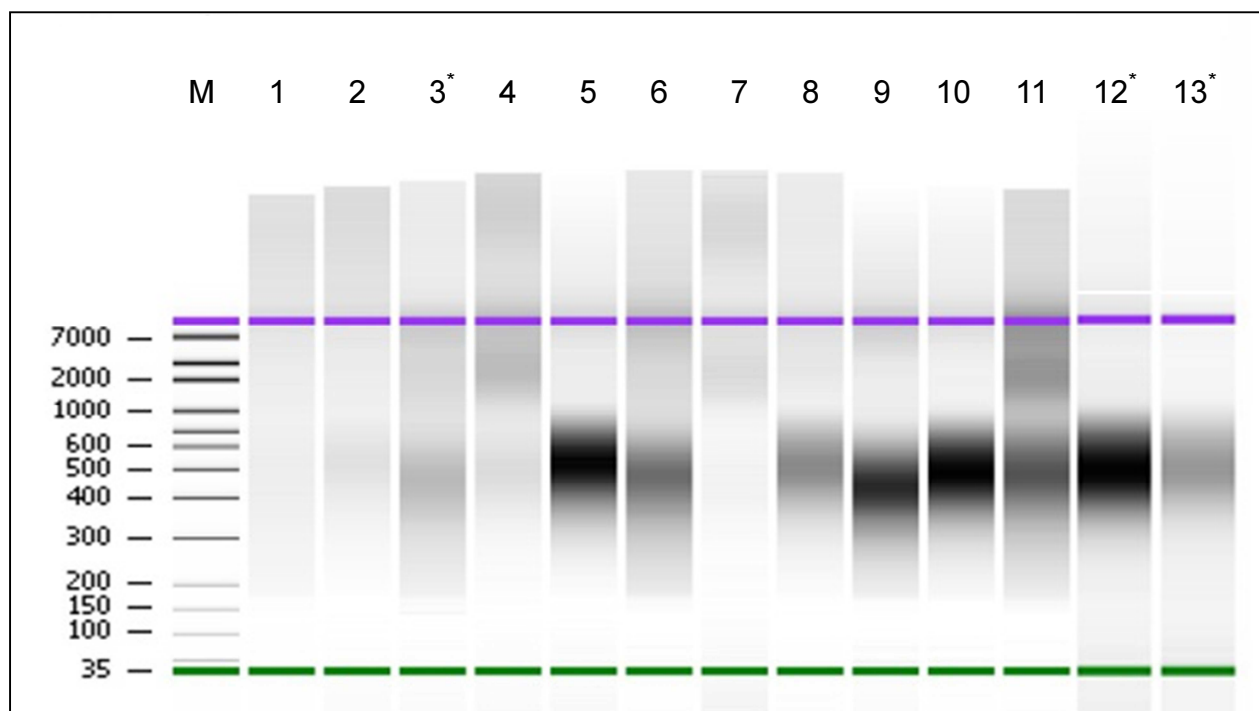
Fonte: Luciano (2020).

Legenda: ID – identificação; sem – semanas; CT – ciclo Threshold; Conc – concentração de DNA da amostra; A – absorvância; T – amostra submetida ao pré-tratamento e purificação; NT – amostra não submetida ao pré-tratamento e purificação; NV – não vacinada; TCO – vacina de cultivo celular; RECOMB – vacina recombinante; CP – controle positivo.

5.6.2 Determinação do tamanho das bibliotecas para o sequenciamento NGS

As bibliotecas foram analisadas no equipamento Agilent 2100 Bioanalyzer (Alemanha), com o kit High Sensitivity DNA (Figuras 28 e 29).

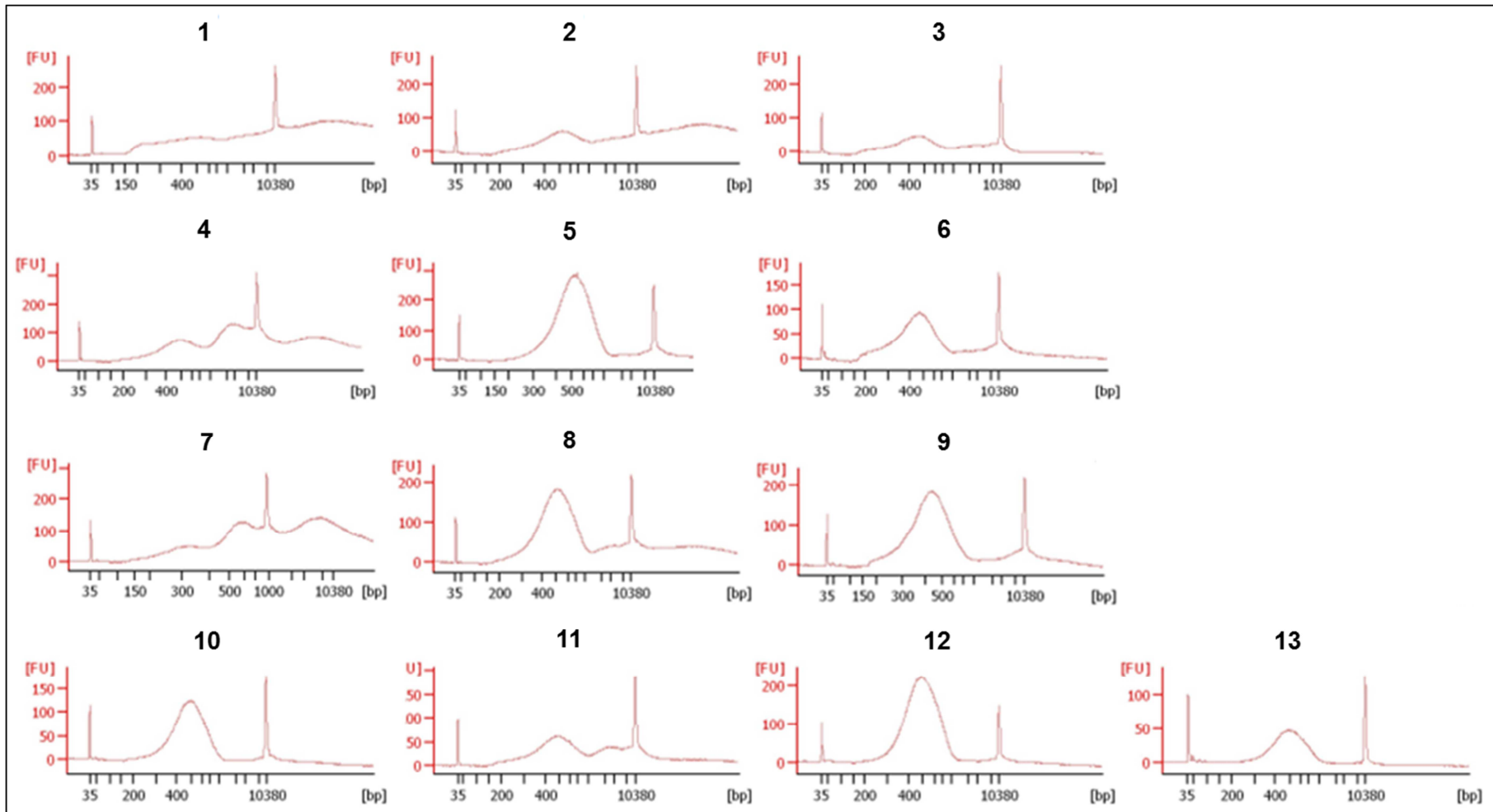
Figura 28 – Eletroforese capilar das bibliotecas das 13 amostras, geradas pelo Bioanalyzer



Fonte: Luciano (2020).

Legenda: Canaletas: **M**) marcador de peso molecular; **1**) IB35494; **2**) CP (vacina CEO Nobilis ILT); **3**) IB30498; **4**) IB1262-18; **5**) IB17221; **6**) IB17222; **7**) IB17235; **8**) IB17236; **9**) IB8088; **10**) IB8096; **11**) IB8104; **12**) IB8083; **13**) IB8098; * amostra não submetida ao pré-tratamento e purificação.

Figura 29 – Eletroferogramas das bibliotecas das 13 amostras, geradas pelo Bioanalyzer

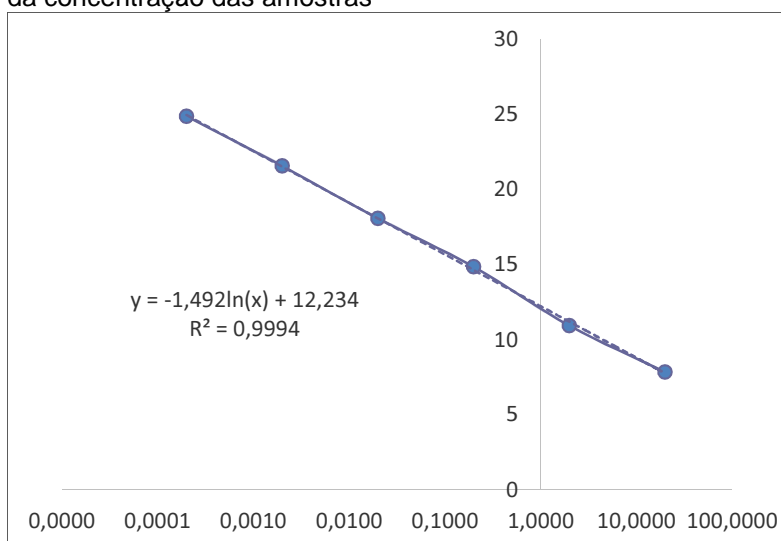


Fonte: Luciano (2020).

Legenda: **1)** IB35494; **2)** CP – controle positivo (vacina CEO Nobilis ILT); **3)** IB30498; **4)** IB1262-18; **5)** IB17221; **6)** IB17222; **7)** IB17235; **8)** IB17236; **9)** IB8088; **10)** IB8096; **11)** IB8104; **12)** IB8083; **13)** IB8098.

As bibliotecas foram quantificadas através da reação de qPCR com o KAPA Library Quantification kit e as concentrações obtidas a partir da curva padrão (Figura 30 e Tabela 15). A diluição das amostras foi de 1:10000 a partir do estoque e o tamanho dos fragmentos variou de 417 a 610 pb.

Figura 30 – Curva padrão da reação de qPCR Kappa, para cálculo da concentração das amostras



Fonte: Luciano, 2020.

Tabela 15 – Concentração de amostras, a partir do qPCR Kappa

Amostra	CT	Conc pM/μL qPCR	Conc Estoque	Tamanho (pb)
IB8083 ^{NT}	10,59	2,7176	27,18	505
IB8088 ^T	11,77	1,2310	12,31	442
IB8096 ^T	11,31	1,6762	16,76	499
IB8098 ^{NT}	14,29	0,2268	2,27	509
IB8104 ^T	11,39	1,5886	15,89	487
IB35494 ^T	10,75	2,4409	24,41	417
IB1262-18 ^T	10,05	3,9046	39,05	533
IB17221 ^T	11,59	1,3890	13,89	524
IB17222 ^T	11,59	1,3890	13,89	463
IB17235 ^T	10,62	2,6634	26,63	610
IB17236 ^T	10,09	3,8012	38,01	515
IB30498 ^{NT}	12,41	0,8011	8,01	460
CP ^T	9,70	4,9385	49,38	525
St1	7,84	19,0356	-	-
St2	10,93	2,3928	-	-
St3	14,85	0,1723	-	-
St4	18,07	0,0199	-	-
St5	21,56	0,0019	-	-
St6	24,87	0,0002	-	-

Fonte: Luciano (2020)

Legenda: St – padrão do kit qPCR Kappa; T – amostra submetida ao pré-tratamento e purificação; NT – amostra não submetida ao pré-tratamento e purificação; CP – controle positivo (vacina CEO Nobilis ILT); CT – ciclo Threshold; Conc - concentração.

Após o sequenciamento NGS, as sequências obtidas foram submetidas às análises de bioinformática e mapeadas com sequências do VLTl depositadas no GenBank: JN542534 (genoma completo), EU104911 (gene ICP4), DQ522947 (gene TK).

O desempenho do sequenciamento de genoma completo foi bastante variável, com leituras entre 3660 e 60713 e comprimento entre 151742 e 154393. Obteve-se de 76,90 a 84,20% de identidade com a sequência JN542534 do GenBank, com uma profundidade média de 5,2 a 138 e cobertura de 1,10 a 99,99%

(Tabela 16). As amostras IB8098, IB30498 e CP apresentaram uma cobertura de 99,20%, 82,80% e 99,99%, respectivamente, comprovando a eficácia da técnica de NGS. As amostras com piores desempenhos foram as IB35494, IB1262-18 e 17235 com coberturas de 1,10%, 3,10% e 1,20% respectivamente. Em todas as amostras foram encontradas sequências do VLTI.

Tabela 16 – Resultado das sequências do genoma completo das amostras, com as leituras mapeadas em relação à sequência JN542534 do VLTI (GenBank).

Amostra	Nº de leituras	Comprimento (pb)	Identidade do pareamento	Profundidade	Cobertura
IB8083 ^{NT}	3660	153470	78,1%	5,2	29,7%
IB8088 ^T	27652	151919	77,6%	51,4	58%
IB8096 ^T	5240	153949	78%	8,3	21%
IB8098 ^{NT}	6050	152513	84,2%	11	99,2%
IB8104 ^T	27686	153020	76,9%	49,5	35,8%
IB35494 ^T	46276	151742	78,5%	135	1,1%
IB1262-18 ^T	15715	151761	78,4%	40,3	3,1%
IB17221 ^T	5450	151806	78%	8,1	19,3%
IB17222 ^T	37663	151912	77,8%	76,1	62,6%
IB17235 ^T	23518	152980	79%	53,7	1,2%
IB17236 ^T	15069	153691	77,1%	24,5	41,7%
IB30498 ^{NT}	60713	154393	77,3%	138	82,8%
CP ^T	13153	153466	78,5%	23	99,99%

Fonte: Luciano (2020).

Legenda: T – amostra submetida ao processo de pré-tratamento e purificação; NT – amostra não submetida ao pré-tratamento e purificação; CP – controle positivo (vacina CEO Nobilis ILT).

As sequências obtidas também foram mapeadas com a estirpe EU104911 (GenBank), para análise do gene ICP4 (Tabela 17). As amostras IB1262-18 e IB17235 não apresentaram *contigs*. Nas demais, o número de leituras variou de 3706 a 13452, com comprimento entre 4616 a 7110 e profundidade média entre 17,5 a 6625,3. Obteve-se um percentual de 78,70 a 87,20% de identidade com a sequência EU104911, com uma cobertura de 4 a 100%. As amostras IB8098 e CP apresentaram uma identidade de 85,10 e 87,20% com a estirpe de referência e uma cobertura de 100% com o gene analisado (Tabela 17).

Tabela 17 – Resultado das sequências mapeadas em relação à estirpe EU104911 (GenBank), para análise do gene ICP4.

Amostra	Nº de leituras	Comprimento	Identidade do pareamento	Profundidade	Cobertura
IB8083 ^{NT}	574	5668	79,4%	20,1	34,5%
IB8088 ^T	4057	5486	79,2%	218,4	77%
IB8096 ^T	520	4616	82%	21,5	35%
IB8098 ^{NT}	453	6021	85,1%	17,5	100%
IB8104 ^T	3706	4902	79,9%	192,8	50,2%
IB35494 ^T	13452	6291	79%	941	4%
IB1262-18 ^T	ND	ND	ND	ND	ND
IB17221 ^T	825	4720	82%	37,3	13,9%
IB17222 ^T	13137	7027	79%	6625,3	70,1%
IB17235 ^T	ND	ND	ND	ND	ND
IB17236 ^T	3617	7110	78,7%	147,1	62%
IB30498 ^{NT}	11713	7963	78,7%	581,5	83,6%
CP ^T	647	7002	87,2%	24,3	100%

Fonte: Luciano (2020).

Legenda: ND: Não detectado; T – amostra submetida ao processo de pré-tratamento e purificação; NT – amostra não submetida ao pré-tratamento e purificação; CP – controle positivo (vacina CEO Nobilis ILT).

As sequências foram mapeadas com a estirpe DQ522947 (GenBank), para análise do gene TK (Tabela 18). As amostras IB35494, IB1262-18 e IB17235 não apresentaram *contigs*. Nas demais, o número de leituras variou de 2 a 19009, com comprimento entre 1183 a 4057 e profundidade média entre 0,5 a 359,2. Obteve-se um percentual de 69 a 99,70% de identidade com a sequência DQ522947, com uma cobertura de 25 a 100%. As amostras IB8098 e IB30498 apresentaram, respectivamente, uma identidade de 79,80 e 78,40% com a estirpe de referência e uma cobertura de 100% e 93,80% com o gene analisado (Tabela 18).

Tabela 18 – Resultado das sequências mapeadas em relação à estirpe DQ522947 (GenBank), para análise do gene TK.

Amostra	Nº de leituras	Comprimento	Identidade do pareamento	Profundidade	Cobertura
IB8083 ^{NT}	18	1280	92,1%	1,4	69,1%
IB8088 ^T	6	1293	99,7%	1,4	61%
IB8096 ^T	2	1183	93%	0,5	25%
IB8098 ^{NT}	382	3492	79,8%	24	100%
IB8104 ^T	3526	2836	80,1%	359,2	34,3%
IB35494 ^T	ND	ND	ND	ND	ND
IB1262-18 ^T	ND	ND	ND	ND	ND
IB17221 ^T	2740	3514	69%	314,1	26,8%
IB17222 ^T	4	1344	98,3%	0,9	35,6%
IB17235 ^T	ND	ND	ND	ND	ND
IB17236 ^T	2384	2872	78,8%	256,2	81,7%
IB30498 ^{NT}	19009	4057	78,4%	1672	93,8%
CP ^T	171	3553	87,2%	13,4	100%

Fonte: Luciano (2020)

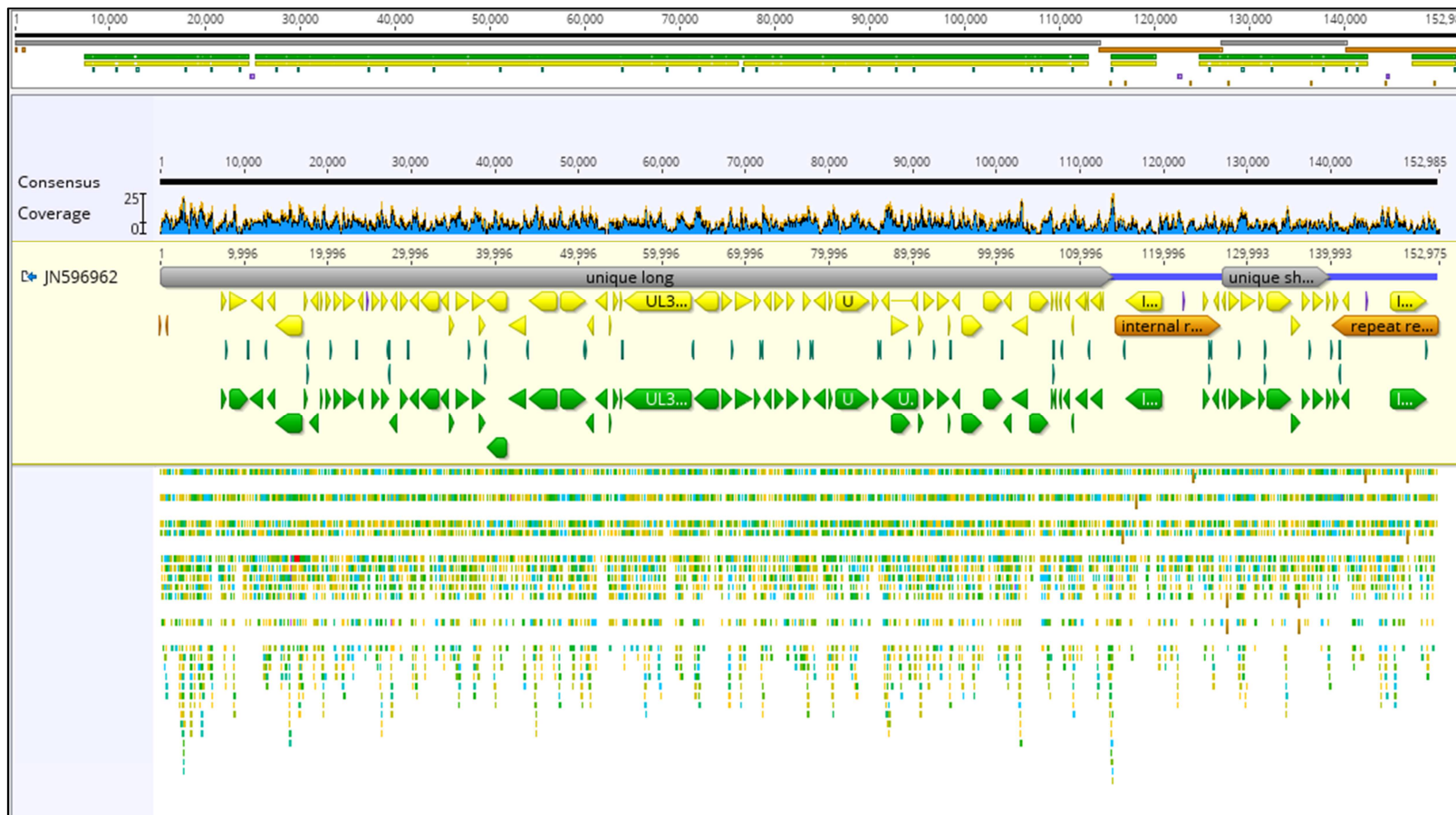
Legenda: ND: Não detectado; T – amostra submetida ao processo de pré-tratamento e purificação; NT – amostra não submetida ao pré-tratamento e purificação; CP – controle positivo (vacina CEO Nobilis ILT).

5.7 MONTAGEM DO GENOMA COMPLETO – AMOSTRA ILTV/CHICKEN/BRAZIL(GUATAPARA-SP)/IB8098/2010)

Das 13 amostras submetidas ao sequenciamento NGS, foi possível a anotação e montagem do genoma completo da amostra IB8098, coletada na região de Guatapar em 2010 (Figura 31).

O sequenciamento NGS da amostra IB8098 gerou um total de 4755 leituras, com um comprimento de 152985 pb e cobertura de 99,8%, em relação  a referência JN596962.

Figura 31- Genoma Completo do VLTI obtido a partir da amostra ILTV/chicken/Brazil(Guatapara-SP)/IB8098/2010



Fonte: Luciano (2020).

5.8 ANÁLISES FILOGENÉTICAS

5.8.1 Análises filogenéticas do gene ICP4 – SANGER

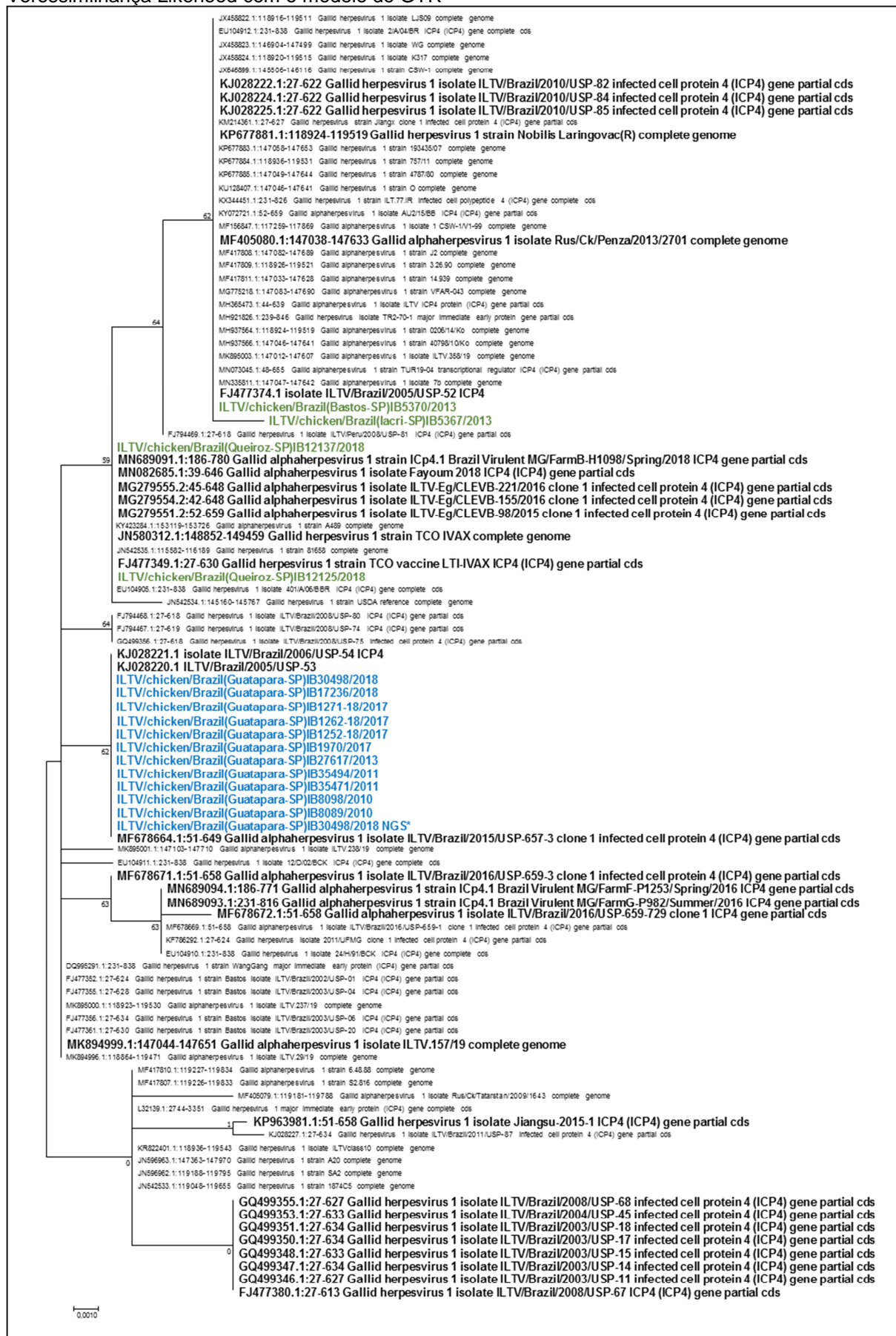
Pelo menos uma amostra foi sequenciada de cada ano em que foi detectado o vírus nas diferentes regiões. Quinze amostras foram submetidas ao sequenciamento para o gene ICP4 do VLTI, sendo que quatro foram provenientes de amostras de Bastos e 11 amostras de Guatapar. Em Bastos, duas amostras de 2013 e duas 2018 foram selecionadas. As 11 sequências provenientes de Guatapar foram coletadas em 2010 (n=2), 2011 (n=2), 2013 (n=1), 2017 (n=4) e 2018 (n=2). As amostras de Bastos agruparam separadamente das sequências de Guatapar (Figura 32). Na rvore filogenética referente ao sequenciamento do gene ICP4 foram incluídas as duas sequências da amostra IB30498, uma obtida pelo sequenciamento por Sanger e outra por NGS.

As duas amostras (IB5367 e IB5730) obtidas em 2013 na região de Bastos agruparam com a estirpe vacinal CEO Nobilis Laringovac (KP677881) e com amostras de Bastos, identificadas em 2010 (KJ028222, KJ028224 e KJ028225), além de uma amostra isolada em Guatapar no ano de 2005 (FJ477374). As outras duas amostras de Bastos, coletadas em 2018 (IB12125 e IB12137), agruparam com a cepa vacinal TCO – LTI-Ivax (JN580312 e FJ477349), com um isolado virulento de Minas Gerais, identificado em 2018 (MN689091) e com estirpes egípcias (MN082685, MG279555, MG279554, MG279551). As amostras de 2013 (IB5367 e IB5730) apresentaram uma identidade de 99,8% entre si, enquanto a amostra IB5730 e a IB5367 apresentaram 100% e 99,8% % de identidade com as amostras de 2018. A amostra IB5730 apresentou 100% com as vacinais e com as sequências de 2010, enquanto a amostra IB5367 apresentou 99,8% de identidade, quando comparada com estas mesmas sequências. Já as amostras de 2018 apresentaram 100% de identidade entre si e 100% de identidade com as estirpes vacinais descritas acima (JN580312 e FJ477349).

As 11 sequências provenientes de Guatapar agruparam-se no mesmo ramo de um isolado de Guatapar (KJ028220) obtido em 2005 e de uma sequência de Barretos (KJ028221) obtida em 2006 (Figura 32). Todas as sequências de Guatapar apresentaram 100% de identidade entre si, quando analisado o gene

ICP4. Estas sequências também apresentaram 100% de identidade com uma amostra brasileira (MF678664), além das sequências da amostra de Guatapar (KJ028220) e de Barretos (KJ028221). Estas sequências apresentaram uma identidade de 99,2% com a estirpe vacinal CEO (KP677881) e de 99,6% com as estirpes TCO (JN580312, FJ477349).

Figura 32 - Análises filogenéticas do gene ICP4, baseadas no método Máxima Verossimilhança Likelihood com o modelo do GTR



Fonte: Luciano (2020).

Legenda: A história evolucionária foi inferida pela utilização do método Máximo Likelihood

baseado no Modelo Hasegawa-Kishino-Yano (HASEGAWA; KISHINO; YANO, 1985). A árvore com a maior probabilidade logarítmica (-852,39) está apresentada. A porcentagem das árvores nas quais as amostras se agrupam é apresentada ao lado dos ramos. A(s) árvore(s) inicial(is) da busca heurística foi (ram) obtidas automaticamente pela aplicação dos algoritmos Neighbour-Join e BioNJ a uma matriz de distâncias pareadas estimadas, usando a abordagem de máxima verossimilhança composta (MCL) e, em seguida, selecionando a topologia com maior valor de log de verossimilhança. A árvore foi desenhada em escala, com os comprimentos dos troncos mensurados em número de substituições por local. A análise foi realizada a partir de 99 sequências de nucleotídeos. A posição dos códons inclusos foram 1°+2°+3°+*noncoding*. Todas as posições com menos de 95% de cobertura local foram eliminadas. Valores menores que 5% de gaps no alinhamento, dados ausentes e bases ambíguas foram permitidas em qualquer posição. Houve um total de 499 posições no conjunto final de dados. As análises evolutivas foram realizadas no MEGA7 (KUMAR, S.; STECHER; TAMURA, 2016); * foram incluídas as duas sequências da amostra IB30498 (Sanger e NGS).

5.8.2 Análises filogenéticas do gene TK – SANGER

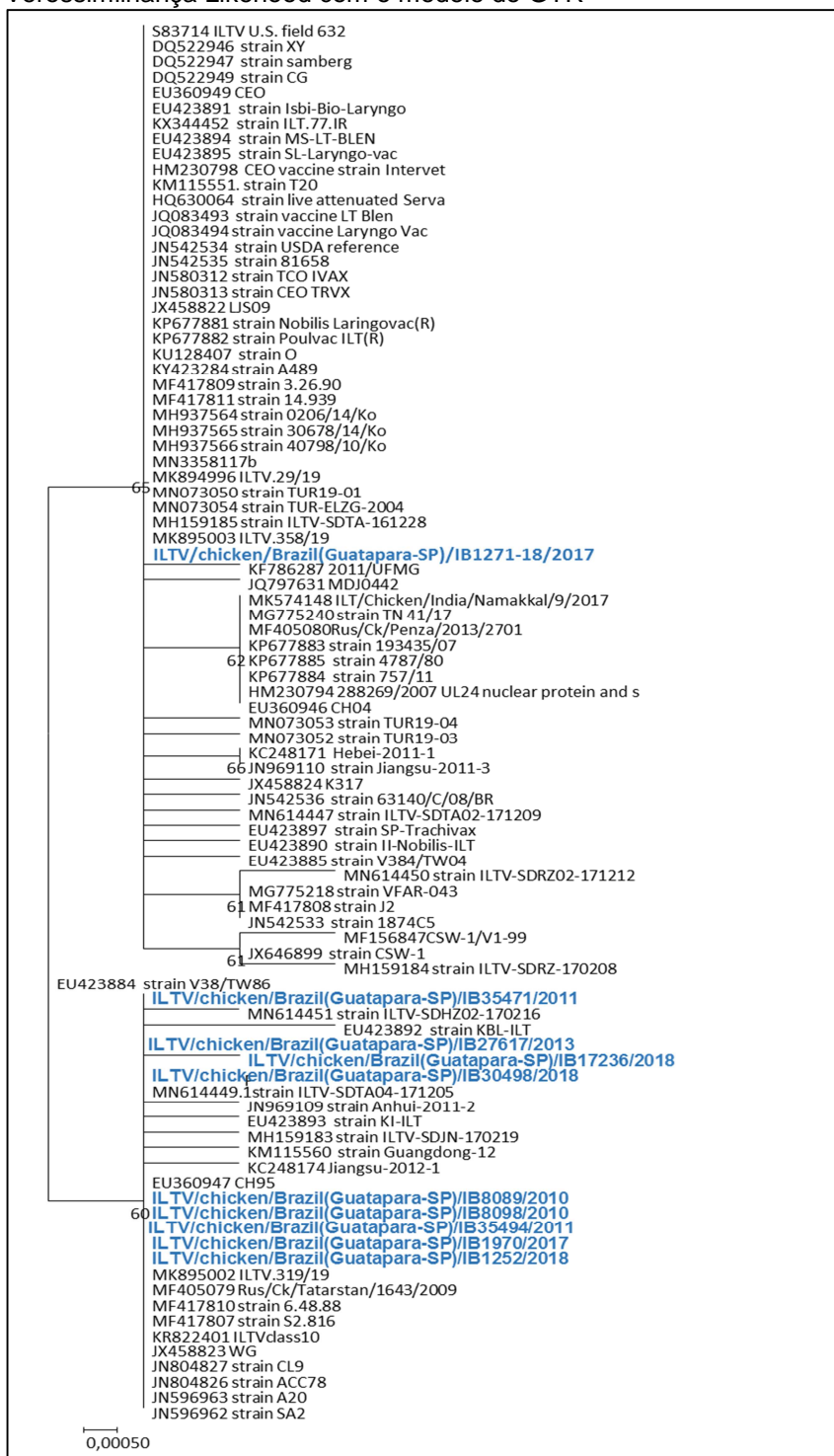
O gene TK não pode ser sequenciado utilizando as amostras de Bastos, enquanto dez amostras de Guatapará foram sequenciadas utilizando primers específicos para o gene TK. Todas as amostras selecionadas da região de Guatapará que tiveram o gene ICP4 sequenciado foram também sequenciadas para o gene TK, exceto uma amostra de 2017.

Nove das dez amostras foram agrupadas com estirpes virulentas e uma amostra coletada em 2017 foi agrupada com estirpes vacinais baseado no gene TK (Figura 33). As nove amostras agruparam com estirpes virulentas identificadas em diferentes países, como Suíça (EU360947), Austrália (MK895002, KR822401, JN804827, JN804826), Rússia (MF405079), Estados Unidos (MF417810 e MF417807), China (JX458823) e estirpes de origem australiana, utilizadas como vacinas vivas CEO na Austrália (JN596963 e JN596962). Dessas nove, oito sequências apresentaram 100% de identidade entre si e com as sequências agrupadas no mesmo ramo (JN596963 e JN596962, EU360947, MK895002, KR822401, JN804827, JN804826, MF405079, MF417810 e MF417807, JX458823). Estas oito amostras Guatapará apresentaram 99,7% de identidade genética com as estirpes vacinais CEO (EU423895, HM230798, HQ630064, JQ083494, JN580313, KP677881 e KP677882) e TCO (JN580312). A amostra IB17236, coletada em 2018, apresentou 99,9% de identidade com as demais sequências citadas anteriores e 99,6% com as estirpes vacinais CEO e TCO.

A amostra coletada em 2017 (IB1271-18) se agrupou com sequências vacinais de TCO (JN580312) e CEO (EU423895, HM230798, HQ630064,

JQ083494, JN580313, KP677881 e KP677882) diferentemente das demais sequências da mesma região nos diferentes anos. Esta amostra IB1217-18 apresentou 100% de identidade com as vacinas TCO e CEO supracitadas.

Figura 33 - Análises filogenéticas do gene TK, baseadas no método Máxima Verossimilhança Likelihood com o modelo do GTR



Fonte: Luciano (2020).

Legenda: A história evolucionária foi inferida pela utilização do método Máximo

Likehood baseado no Modelo Geral Reversível no Tempo (GTR) (TAMURA; NEI; KUMAR, 2004). A árvore com a maior probabilidade logarítmica (-1193,20) está apresentada. A porcentagem das árvores nas quais as amostras se agrupam é apresentada ao lado dos ramos. A(s) árvore(s) inicial(ais) da busca heurística foi (ram) obtidas automaticamente pela aplicação dos algoritmos Neighbour-Join e BioNJ a uma matriz de distâncias pareadas estimadas, usando a abordagem de máxima verossimilhança composta (MCL) e, em seguida, selecionando a topologia com maior valor de log de verossimilhança. A distribuição gama discreta foi utilizada para calcular as taxas evolucionárias nas diferentes posições (5 categorias (+G, parâmetro = 200,0000)). A árvore foi desenhada em escala, com os comprimentos dos troncos mensurados em número de substituições por local. A análise foi realizada a partir de 91 sequências de nucleotídeos. A posição dos códons inclusos foram 1°+2°+3°+*noncoding*. Todas as posições com menos de 95% de cobertura local foram eliminadas. Valores menores que 5% de gaps no alinhamento, dados ausentes e bases ambíguas foram permitidas em qualquer posição. Houve um total de 703 posições no conjunto final de dados. As análises evolutivas foram realizadas no MEGA7 (KUMAR, S.; STECHER; TAMURA, 2016).

5.8.3 Análises Filogenéticas dos genes ICP4 e TK – NGS

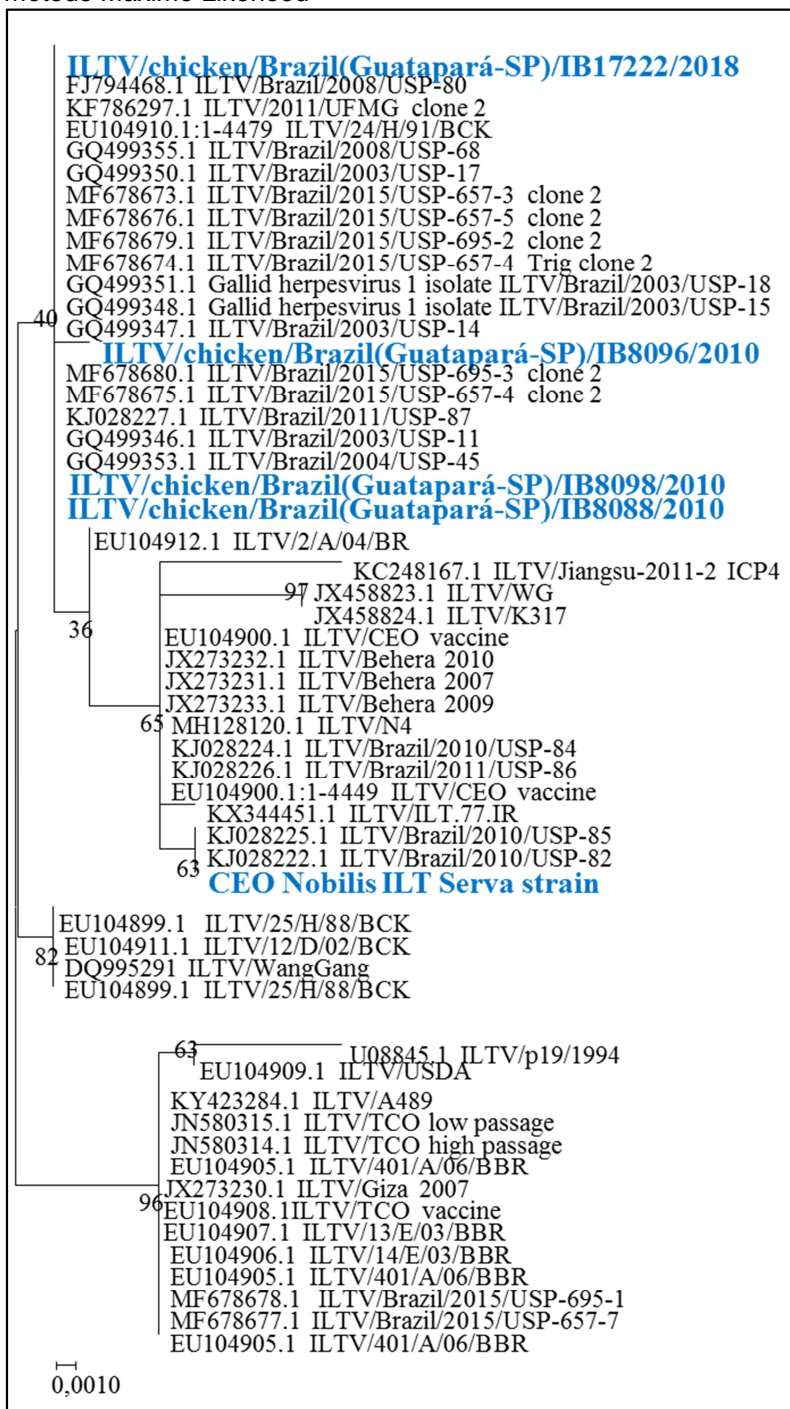
5.8.3.1 Gene ICP4

A partir das sequências obtidas do NGS, foi possível realizar análises filogenéticas em outra região do gene ICP4 (localizada entre os nucleotídeos 115319 e 115889 do VLTI) de quatro amostras detectadas em Guatapará e coletadas em 2010 (n=3) e 2018 (n=1).

As sequências das quatro amostras de Guatapará (IB17222, IB8096, IB8098 e IB8088) agruparam-se em um mesmo clado, com os isolados virulentos de campo, provenientes de Bastos, coletados em 2003, 2004, 2008, 2011 e 2015 (GQ499346, GQ499347, GQ499348, GQ499350, GQ499351, GQ499353, GQ499355, FJ794468, KJ028227, MF678673, MF678674, MF678675, MF678676, MF678679 e MF678680), com um isolado de Minas Gerais de 2011 (KF786297) e com uma estirpe norte-americana (EU104910) (Figura 34). As amostras de Guatapará agruparam separadamente das sequências de estirpes vacinais de CEO (EU104900 e da vacina CEO Nobilis ILT Serva strain – controle positivo utilizado para o sequenciamento NGS) e das vacinas TCO (JN580315, JN580314 e EU104900) (Figura 34). Em relação à vacina CEO (EU104900), a identidade das sequências foi de 99,6% (8088/2010), 99,5% (IB8098/2010), 99,4% (IB17222/2018) e 99,3% (IB8096/2010). Considerando as vacinas TCO (JN580314, JN580315 e EU104900),

a identidade foi de 99,2% (8088/2010), 99,1% (IB8098/2010), 99% (IB17222/2018) e 98,9,% (IB8096/2010).

Figura 34 - Análises filogenéticas do gene ICP4 (região localizada entre os nucleotídeos 115319 e 115889 do VLT1), utilizando o método Máximo Likelihood



Fonte: Luciano (2020).

Legenda: A história evolucionária foi inferida pela utilização do método Máximo Likelihood baseado no Modelo Geral Reversível no Tempo (GTR) (TAMURA; NEI; KUMAR, 2004). A rvore com a maior probabilidade logarítmica (-938,86) está apresentada. A porcentagem das árvores nas quais as amostras se agrupam  apresentada ao lado dos ramos. A(s) rvore(s) inicial(is) da busca heurística

foi (ram) obtidas automaticamente pela aplicação dos algoritmos Neighbour-Join e BioNJ a uma matriz de distâncias pareadas estimadas, usando a abordagem de máxima verossimilhança composta (MCL) e, em seguida, selecionando a topologia com maior valor de log de verossimilhança. A distribuição gamma discreta foi utilizada para calcular as taxas evolucionárias nas diferentes posições (5 categorias (+G, parâmetro = 0.0500)). A árvore foi desenhada em escala, com os comprimentos dos troncos mensurados em número de substituições por local. A análise foi realizada a partir de 55 sequências de nucleotídeos. A posição dos códons inclusos foram 1°+2°+3°+*noncoding*. Todas as posições com menos de 95% de cobertura local foram eliminadas. Valores menores que 5% de gaps no alinhamento, dados ausentes e bases ambíguas foram permitidas em qualquer posição. Houve um total de 556 posições no conjunto final de dados. As análises evolutivas foram realizadas no MEGA7 (KUMAR, S.; STECHER; TAMURA, 2016).

5.8.3.2 Gene TK

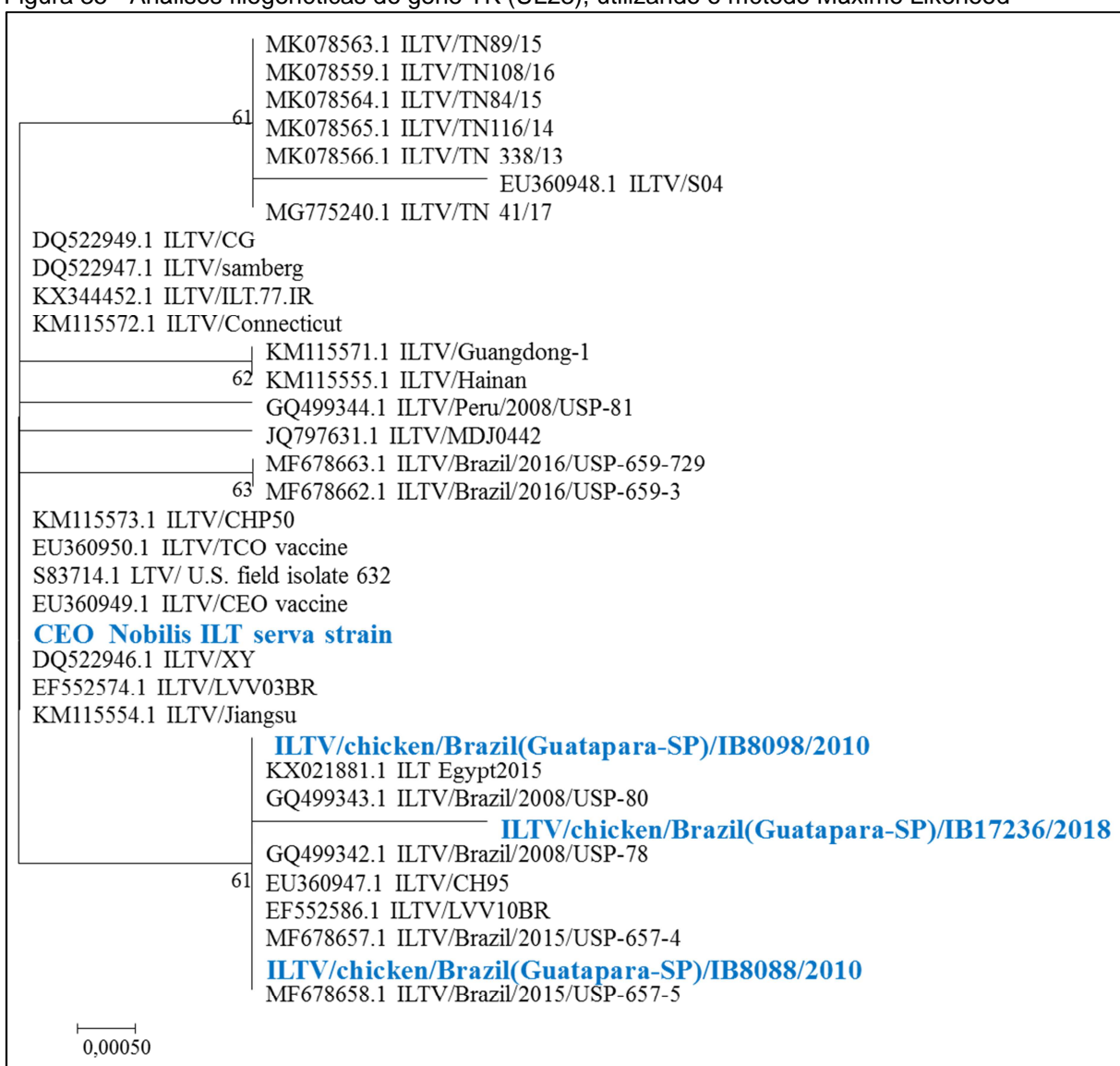
As sequências obtidas através do NGS possibilitaram as análises filogenéticas para o gene TK de três amostras, sendo duas de 2010 (IB8098 e IB8088) e de 2018 (IB17236), provenientes de Guatapará. As sequências foram agrupadas com as amostras brasileiras (GQ499342, GQ499343, MF678657, MF678658 e EF552586), obtidas em 2007, 2008 e 2015, além de uma estirpe proveniente do Egito (KX021881) e um isolado de campo da Suíça (EU360947) – Figura 35. As três amostras agruparam separadamente das sequências das vacinas CEO (EU360949 e da vacina CEO Nobilis ILT Serva strain – controle positivo utilizado para o sequenciamento NGS) e da vacina TCO (EU360950) (Figura 35).

A identidade entre as sequências das amostras IB8098 e IB 8088 foi de 99,8%, entre as amostras IB8098 e IB17236 foi de 99,1% e entre as amostras IB8088 e IB17236 foi de 98,9%. A identidade entre as amostras de Guatapará e as amostras brasileiras, do Egito e da Suíça foi de 100% em relação à amostra IB8098, de 99,8% (amostra IB8088) e de 99,1% (amostra IB17236). Em relação à vacina CEO (EU360949), a identidade das sequências foi de 99,8% (8098/2010), 99,6% (IB8088/2010) e 98,9% (IB17236/2018), sendo que os mesmos percentuais de identidade também foram obtidos em relação às sequências das vacinas TCO (JN580315, JN580314 e JN580312).

Os resultados obtidos pelas análises filogenéticas para o gene TK, em relação às duas metodologias de sequenciamento empregadas neste estudo (Sanger e NGS) foram semelhantes, sendo possível comparar as amostras IB8098 e IB17236. Ambas as amostras agruparam de modo similar; porém, houve uma pequena variação no percentual de identidade obtido entre as duas amostras no sequenciamento tradicional (99,9%) e no NGS (99,8%). Já em relação às vacinas

CEO (EU360949, EU423895, HM230798, HQ6300064, JQ083494, JN580313, KP677881 E KP677882) e TCO (EU360950, JN580312), a identidade das amostras foi de 99,98% (IB17236) e 99,96% (IB17236). Ao se comparar as duas metodologias de sequenciamento (Sanger e NGS), pôde-se constatar que as amostras apresentaram valores de identidade maior na metodologia de NGS do que pelo método tradicional (Sanger).

Figura 35 - Análises filogenéticas do gene TK (UL23), utilizando o método Máximo Likelihood



Fonte: Luciano (2020).

A história evolucionária foi inferida pela utilização do método Máximo Likelihood baseado no Modelo Geral Reversível no Tempo (GTR) (TAMURA; NEI; KUMAR, 2004). A árvore com a maior probabilidade logarítmica (-743,61) está apresentada. A porcentagem das árvores nas quais as amostras se agrupam é apresentada ao lado dos ramos. A(s) árvore(s) inicial(ais) da busca heurística foi (ram) obtidas automaticamente pela aplicação dos algoritmos Neighbour-Join e BioNJ a uma matriz de distâncias pareadas estimadas, usando a abordagem de máxima verossimilhança composta (MCL) e, em seguida, selecionando a topologia com maior valor de log de verossimilhança. A distribuição gamma discreta foi utilizada para calcular as taxas evolucionárias nas diferentes

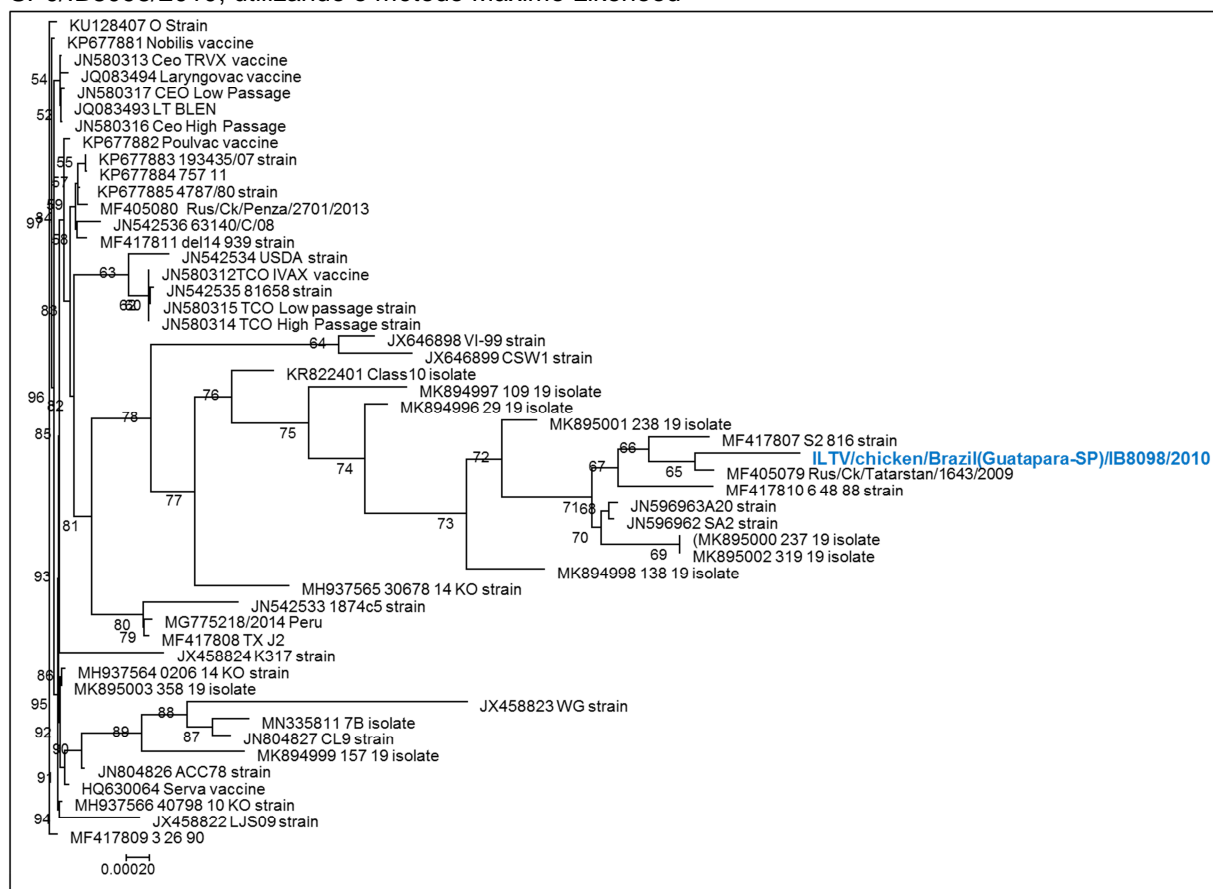
posições (5 categorias (+G, parâmetro = 200,000)). A árvore foi desenhada em escala, com os comprimentos dos troncos mensurados em número de substituições por local. A análise foi realizada a partir de 35 sequências de nucleotídeos. A posição dos códons inclusos foram 1°+2°+3°+*noncoding*. Todas as posições com menos de 95% de cobertura local foram eliminadas. Valores menores que 5% de gaps no alinhamento, dados ausentes e bases ambíguas foram permitidas em qualquer posição. Houve um total de 493 posições no conjunto final de dados. As análises evolutivas foram realizadas no MEGA7 (KUMAR, S.; STECHER; TAMURA, 2016).

5.8.4 Análise Filogenética da amostra ILTV/chicken/Brazil(Guatapara-SP)/IB8098/2010

A árvore filogenética foi construída a partir do genoma completo da estirpe IB8098/2010, coletada em 2010, com as demais sequências de genomas completos do VLTÍ disponíveis no GenBank (Figura 36 e Quadro 7). Convém destacar que a amostra IB8098/2010 agrupou em um ramo distinto das estirpes vacinais TCO (JN580312, JN580314 e JN580315) e das vacinas CEO (KP677881, JN580313, JQ083494, JN580317, JN580316 e KP677882).

A análise filogenética demonstrou que esta amostra agrupou com a estirpe de campo russa (MF405079), apresentando uma identidade de 99,90% entre ambas (Tabela 19). A amostra IB8098 apresentou uma identidade de 99,82% com as sequências das vacinas australianas (A20 e SA2), além de 99,81% com a estirpe norte-americana (MF417810). Também houve uma identidade de 99,79% com as sequências de cepas de campo (MK895000 e MK895002) e 99,78% com a MK895001, provenientes da Austrália (Tabela 19). A identidade da sequência IB8098/2010 foi de 99,65% com as vacinas TCO (JN580312, JN580314, JN580315). Em relação às estirpes vacinais CEO (JN580313, JN580317, JN580316, JQ083494, JQ083493, KP677881, KP677882), houve uma identidade de 99,64% com as mesmas e 99,63% de identidade com a cepa vacinal Serva (HQ630064) (Figura 36 e Tabela 19).

Figura 36 - Análises filogenéticas do genoma completo da amostra ILTV/chicken/Brazil(Guatapara-SP)/IB8098/2010, utilizando o método Máximo Likelihood



Fonte: Luciano (2020).

Legenda: A história evolucionária foi inferida pela utilização do método Máximo Likelihood baseado no Modelo Geral Reversível no Tempo (GTR) (TAMURA; NEI; KUMAR, 2004). A árvore com a maior probabilidade logarítmica está apresentada. A porcentagem das árvores nas quais as amostras se agrupam é apresentada ao lado dos ramos. A(s) árvore(s) inicial(ais) da busca heurística foi (ram) obtidas automaticamente pela aplicação dos algoritmos Neighbour-Join e BioNJ a uma matriz de distâncias pareadas estimadas, usando a abordagem de máxima verossimilhança composta (MCL) e, em seguida, selecionando a topologia com maior valor de log de verossimilhança. A distribuição gamma discreta foi utilizada para calcular as taxas evolucionárias nas diferentes posições (5 categorias). A árvore foi desenhada em escala, com os comprimentos dos troncos mensurados em número de substituições por local. A posição dos códons inclusos foram $1^{\circ}+2^{\circ}+3^{\circ}+nonconding$. Todas as posições com menos de 95% de cobertura local foram eliminadas. Valores menores que 5% de gaps no alinhamento, dados ausentes e bases ambíguas foram permitidas em qualquer posição. As análises evolutivas foram realizadas no MEGA7 (KUMAR, S.; STECHER; TAMURA, 2016).

Quadro 7 - Informações detalhadas dos genomas completos do VLTi disponíveis no GenBank (acesso em 06/09/2020), utilizados no alinhamento e análises filogenéticas do genoma completo da amostra IB8098/2010)

GenBank	Estirpe	Origem	Ano	Comprimento (pb)	OBS	Nome Comercial	Referência
MF405079	Rus/Ck/Tatarstan/1643/2009	Rússia	2009	153.933	Estirpe de campo (virulenta)	-	GenBank
MF417807	S2.816 (pavão)	EUA	2002	154.001	Estirpe de campo (virulenta)	-	Spatz et al., 2019
MF417810	6.48.88 (subsistência)	EUA	1988	154.022	Estirpe de campo (virulenta)	-	Spatz et al., 2019
JN596963	A20	Austrália	1966	153.985	Vacina CEO	Poulvac Laryngo (Zoetis)	Spatz et al., 2019
JN596962	SA2	Austrália	1983	153.982	Vacina CEO	Poulvac Laryngo SA2 (Zoetis)	Spatz et al., 2019
MK895000	237/19	Austrália	2019	152.713	Estirpe de campo (atenuada)	-	Fakhri et al.,2020
MK895002	319/19	Austrália	2019	152.686	Estirpe de campo (atenuada)	-	Fakhri et al.,2020
MK895001	238/19	Austrália	2019	152.717	Estirpe de campo (atenuada)	-	Fakhri et al.,2020
JN580315	TCO_LP (low passages)	EUA	1991	155.465	Vacina TCO	-	Spatz et al., 2019
JN580314	TCO_HP (high passages)	EUA	1991	150.335	Vacina TCO	-	Spatz et al., 2019
JN580312	TCO-IVAX	EUA	1983	155.465	Vacina TCO	LT-IVAX (Schering Plough)	Spatz et al., 2019
JN542534	USDA	EUA	1960	151.767	Estirpe de campo (virulenta)	-	Spatz et al., 2019
KP677881	Nobilis Laringovac – Cepa Serva	Itália	-	151.756	Vacina CEO	Nobilis Laringovac (MSD)	Piccirillo et al., 2016
JN580313	CEO_TRVX	EUA	1983	153.647	Vacina CEO	Trachivax (Merck)	Garcia et al., 2013
JQ083494	Laryngo-Vac	EUA	1975	153.640	Vacina CEO	Laryngo-Vac (Zoetis)	Spatz et al., 2019
JN580317	CEO_LP (low passages)	EUA	1990	153.641	Vacina CEO	-	Garcia et al., 2013
JN580316	CEO_HP (high passages)	EUA	1990	153.647	Vacina CEO	-	Garcia et al., 2013
JQ083493	LT-Blen	EUA	1975	153.639	Vacina CEO	LT-Blen (Merrial)	Spatz et al., 2019
HQ630064	Serva	Europa	-	153.645	Vacina CEO	Nobilis ILT (Intervet)	Spatz et al., 2019

Fonte: Adaptado de Spatz (2019).

Tabela 19 – Estimativa das identidades genéticas entre as sequências em comparação com a amostra IB8098/2010

Referência	Estirpe	IB8098	JN580313	JN580317	JN580316	JQ083494	JQ083493	KP677881	KP677882	HQ630064	MF417810	JN596963	JN596962	MK895000	MK895002	MK895001	MF405079	JN580314	JN580312	JN580315	
IB8098	BRAZIL 2010																				
JN580313	Ceo_TRVX	99,64																			
JN580317	CEO_LP	99,64	100,00																		
JN580316	Ceo_HP	99,64	100,00	100,00																	
JQ083494	Laryngovac	99,64	99,99	99,99	99,99																
JQ083493	LT_BLEN	99,64	100,00	100,00	100,00	99,99															
KP677881	Nobilis	99,64	100,00	99,99	99,99	99,99	100,00														
KP677882	Poulvac	99,64	99,99	99,99	99,99	100,00	99,99	99,99													
HQ630064	Serva	99,63	99,99	99,98	99,99	99,98	99,99	99,99	99,99												
MF417810	6_48_88	99,81	99,61	99,60	99,61	99,60	99,61	99,60	99,61	99,60											
JN596963	A20	99,82	99,59	99,58	99,59	99,58	99,59	99,58	99,59	99,59	99,90										
JN596962	SA2	99,82	99,59	99,58	99,59	99,58	99,59	99,58	99,59	99,59	99,91	100,00									
MK895000	237_19	99,79	99,66	99,65	99,66	99,65	99,66	99,66	99,66	99,65	99,85	99,93	99,93								
MK895002	319_19	99,79	99,66	99,65	99,66	99,65	99,66	99,66	99,66	99,65	99,85	99,93	99,93	100,00							
MK895001	238_19	99,78	99,70	99,69	99,70	99,69	99,70	99,70	99,70	99,69	99,81	99,89	99,89	99,83	99,83						
MF405079	RUS1643	99,90	99,59	99,59	99,59	99,59	99,59	99,59	99,59	99,59	99,86	99,89	99,89	99,86	99,86	99,81					
JN580314	TCO_HP	99,65	99,93	99,93	99,93	99,93	99,93	99,93	99,93	99,93	99,62	99,60	99,60	99,66	99,66	99,69	99,60				
JN580312	TCO_IVAX	99,65	99,93	99,93	99,93	99,93	99,93	99,93	99,93	99,93	99,62	99,60	99,60	99,66	99,66	99,69	99,60	100,00			
JN580315	TCO_LP	99,65	99,93	99,93	99,93	99,93	99,93	99,93	99,93	99,92	99,61	99,60	99,60	99,66	99,66	99,69	99,59	100,00	100,00		
JN542534	USDA	99,64	99,91	99,91	99,91	99,91	99,91	99,91	99,91	99,91	99,63	99,61	99,61	99,66	99,66	99,69	99,61	99,95	99,95	99,95	

Fonte: Luciano (2020).

Legenda: O número de substituições de base entre as sequências por local é demonstrado. Análises foram realizadas pelo método Máximo Likelihood (TAMURA; NEI; KUMAR, 2004). A análise foi realizada partir de 50 sequências de nucleotídeos. A posição dos códons inclusos foram 1°+2°+3°+nonconding. Todas as posições com menos de 95% de cobertura local foram eliminadas. Valores menores que 5% de gaps no alinhamento, dados ausentes e bases ambíguas foram permitidas em qualquer posição. Houve um total de 136235 posições no conjunto final de dados. As análises evolutivas foram realizadas no MEGA7 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016).

6 DISCUSSÃO

A avicultura industrial é uma atividade econômica extremamente importante para o Brasil e para o mundo, visto que o país é o principal exportador de carne de frango e o terceiro maior produtor (ABPA, 2020). O setor de postura comercial também se destaca como um mercado em expansão. Neste contexto, o estado de São Paulo é o maior produtor de ovos do país e o município de Bastos, o principal produtor de ovos paulista, com cerca de 5 bilhões de ovos por ano (BECK, 2019). Além disto, o Brasil tem se consolidado como uma plataforma de exportação de ovos férteis e de material genético avícola, atingindo a comercialização de 1.037 toneladas no ano passado, uma atividade que gerou 82,9 milhões de dólares (ABPA, 2020).

Os dados acima demonstram a relevância da atividade avícola nacional e a importância do controle de enfermidades como a IA, DNC e LTI. A OIE estabeleceu os princípios da compartimentação, com a finalidade de manter diferentes subpopulações com “status” sanitários específicos dentro de um território, sendo que o compartimento é definido por níveis de biossegurança ou de riscos de infecções dentro de um território (OIE, 2019b). Diante do crescimento populacional e a demanda mundial crescente por carne de frango e ovos, produzidos com elevada qualidade, a compartimentação possibilita a importação e exportação de produtos avícolas pelo compartimento, desde que sejam empregadas medidas de controle e biossegurança, mesmo que o país tenha ocorrência de surtos, como a IAAP, por exemplo (SWAYNE; HILL; CLIFFORD, 2017).

No Brasil, o projeto de compartimentação foi instituído através da Instrução Normativa nº 21, de 21/10/2014, que estabeleceu as normas técnicas de Certificação Sanitária de Compartimentação da Cadeia Produtiva Avícola para a infecção pelo VIA e VDNC. Esta legislação aborda a vigilância epidemiológica a ser realizada no compartimento, contemplando granjas de reprodução de corte e as criações de aves cadastradas no raio aproximado de 1 km redor das unidades de produção e unidades funcionais associadas (BRASIL, 2014). Estas criações a serem avaliadas compreendem também as propriedades que possuem aves de subsistência, que foram foco amostral deste estudo. O artigo 33 da legislação supracitada determina as técnicas a serem utilizadas para o diagnóstico de Influenza aviária e Doença de Newcastle, que incluem o PCR em tempo real. O Decreto nº

61.285, de 27/05/2015, instituiu, junto à Secretaria de Agricultura e Abastecimento (SAA), o Comitê de Elaboração do Plano Estadual de Prevenção da Influenza Aviária no plantel avícola do Estado de São Paulo, com o objetivo de estabelecer medidas de controle e erradicação para a avicultura industrial e para o segmento que envolve aves silvestres cativas, migratórias, autóctones e de criações informais (as quais incluem aves de subsistência), com vistas à prevenção da introdução e difusão do agente etiológico da Influenza aviária (SÃO PAULO, 2015).

Neste estudo, realizou-se a vigilância epidemiológica de três enfermidades de importância significativa para a avicultura brasileira, sendo controladas pelo MAPA, através do PNSA: IA, DNC e LTI (BRASIL, 2002; 2006; 2013a; SDA-MAPA, 2013). Foram avaliados dois sistemas de criação: 1) aves de subsistência, localizadas entorno de propriedades avícolas de reprodutoras, em três municípios do estado de São Paulo, através da vigilância epidemiológica para o VIA e o VDNC; 2) o monitoramento de duas áreas endêmicas para o VLTi, em aves de postura comercial, localizadas em Bastos e Guatapar, respectivamente.

Os resultados obtidos, a partir das amostras de aves de subsistência, provenientes de propriedades localizadas no entorno de estabelecimentos avícolas de reprodutoras, corroboram com o status sanitário do Brasil como livre de influenza aviária notificvel (IAAP e IAAP com os subtipos H5 e H7). A doença é considerada exótica, sendo que os subtipos H5 e H7 do VIA nunca foram detectados no Brasil (OIE, 2020c). Outros estudos também não conseguiram identificar os subtipos H5, H7 e vírus de IAAP no monitoramento de aves de subsistência, localizadas no entorno de sítios de aves migratórias ou sítios de invernada, onde não houve a detecção de nenhuma amostra do vírus de IAAP. Porém, outros subtipos do VIA baixa virulência foram detectados em diferentes populações de aves, provenientes de diferentes regiões brasileiras, indicando que há a circulação de VIA (MOTA et al., 2013; DE ARAUJO et al., 2014; REISCHAK, 2016). Araújo e colaboradores (2018) relataram a presença de estirpes de IABP em aves migratórias localizadas no Parque Nacional da Lagoa do Peixe, no Rio Grande do Sul, tais como H2N2, H6Nx, H6N1, H9N2 e H12N5. Por outro lado, um inquérito realizado em espécimes de Papagaio-da-cauda-vermelha (*Amazona brasiliensis*) em Ilha Rasa, uma área de proteção ambiental localizada no estado do Paraná, não identificou nenhuma amostra positiva para os vírus de IA e DNC, através do ensaio de PCR em tempo real (VAZ et al., 2017).

O vírus da doença de Newcastle parece circular no país, de acordo com estudos, tanto em aves silvestres quanto em aves domésticas (MARKS et al., 2014; ORSI et al., 2010a). Apesar da grande variabilidade genética do DNC, todos são pertencentes ao mesmo sorotipo, não havendo distinção entre estirpes velogênicas e lentogênicas (DIMITROV et al., 2019). Porém, a detecção de vírus velogênicos ou mesogênicos, que são notificáveis, não ocorre em lotes comerciais desde 2001 (OIE, 2020b). Um estudo identificou estirpes lentogênicas, caracterizadas pelo teste do índice da patogenicidade intracerebral, em amostras de lotes de frangos de corte comerciais obtidas entre 2003 e 2005. Outro estudo também identificou vírus vacinais em aves silvestres no país (AYALA et al., 2016). Estes estudos indicam que as estirpes circulantes identificadas foram estirpes vacinais, o que sugere uma grande circulação das estirpes vacinais. Em nosso estudo, não houve a detecção molecular do vírus velogênico de DNC, concordando com os dados obtidos por alguns autores (ORSI et al. 2010b; MARKS et al. 2014).

O presente trabalho também avaliou a circulação do VLTI em duas regiões endêmicas de LTI no Estado de São Paulo (Bastos e Guatapar), durante 10 anos (2010 a 2018). Para tanto, foi utilizada a técnica de PCR para a detecção do gene ICP4 do VLTI (CHACON; FERREIRA, 2009). A circulação do VLTI já foi descrita em Bastos, desde a ocorrência dos surtos em 2002 (BUCHALA, 2008; CHACON; FERREIRA, 2009; PARRA et al., 2015) e em Guatapar (LUCIANO et al., 2011; FARRA, 2014), além de Minas Gerais (PREIS et al., 2014; COUTO et al., 2015). Um estudo também foi publicado a respeito da transmissão e persistência de estirpes de campo virulentas e cepas vacinais do VLTI em regiões com e sem a utilização de vacinas no país (CHACON et al., 2015). Análises moleculares do VLTI são utilizadas para a determinação das origens de surtos na indústria avícola mundial, além de diferenciar estirpes de campo e cepas vacinais (CHACON; MIZUMA; PIANTINO FERREIRA, 2010; PREIS et al., 2013; CHACON et al., 2015; COUTO et al., 2015; BAYOUMI et al., 2020). Para investigar a origem do VLTI circulantes nas duas áreas analisadas, foi utilizado o sequenciamento dos genes ICP4 e TK pelo método de Sanger (BAYOUMI et al., 2020; CHACON et al., 2010; CHACON et al., 2015; COUTO et al., 2015). Também foi realizado o sequenciamento NGS, tanto em análises filogenéticas de partes do genoma (ICP4 e TK), quando do genoma completo. Esta metodologia tem gerado uma grande quantidade de informações

sobre o VLTI, esclarecendo diversos aspectos da epidemiologia molecular deste agente (PICCIRRILO et al., 2016).

Neste estudo, houve a detecção do VLTI com uma variabilidade ao longo dos anos, nos lotes de postura comercial avaliados nas regiões quarentenadas, que utilizaram diferentes esquemas vacinais. Atualmente, as duas regiões utilizam somente vacinas recombinantes (SÃO PAULO, 2012; 2013; BRASIL 2018). A região de Bastos adotou um programa vacinal com vacinas vivas atenuadas CEO (2004), sendo posteriormente substituídas pela vacina TCO (2006) e recombinantes (2012). No relato do surto ocorrido em Bastos, a partir de 2002, a doença foi controlada com a utilização da vacinação CEO, sendo que a partir junho de 2004, nenhum novo caso de LTI foi observado na região. Em 2005, a Resolução nº 43 (de 17/11/2005) declarou a LTI controlada com vacinação (BUCHALA, 2008).

O VLTI foi detectado em 11,8% e 12,6% das amostras testadas de Bastos em 2013 e 2018. Quatro amostras foram sequenciadas por Sanger (ICP4), duas de 2013 (IB5730 e IB5367) e duas de 2018 (IB12125 e IB12137). As amostras de 2013 foram relacionadas com a estirpe CEO Nobilis Laringovac (KP677881), com 100% e 99% de identidade com a vacina, utilizada na região no período de 2004 a 2006. Também agruparam com amostras de Bastos, identificadas em 2010 (KJ028222, KJ028224 e KJ028225) e caracterizadas como CEO por Chacon e colaboradores (2015). As amostras de 2013 (IB5370 e IB5367) também agruparam com uma amostra isolada em Guatapará (FJ477374), em 2005, em um período anterior aos surtos notificados naquela região; porém a estirpe também foi caracterizada como CEO (CHACON et al., 2015). Este mesmo estudo descreveu a identificação de um isolado de campo (KJ028220), relacionado com estirpes circulantes em Bastos e uma amostra proveniente de Barretos (KJ028221) (CHACON et al., 2015). Esses dados demonstram que havia uma circulação do VLTI em outros locais do estado de São Paulo, em áreas onde a vacinação era proibida. As outras duas amostras, coletadas em 2018, agruparam com a vacina TCO – LTI – Ivax (JN580312 e FJ477349), com 100% de identidade com essas sequências vacinais.

Estudos de epidemiologia molecular, realizados na América do Norte e na Europa sugerem que isolados do VLTI, circulando em área com elevada densidade de aves estão relacionados com estirpes vacinais (SPATZ et al., 2019). Outros autores destacam que a vacina CEO possui o potencial de reversão de virulência, podendo se tornar uma cepa circulante e prevalente no campo (GUY; BARNES;

SMITH, 1991; GARCIA, 2017; PALOMINO-TAPIA et al., 2019). Uma possível explicação, poderia se basear no fato de que as vacinas recombinantes conferem uma proteção parcial no controle de LTI e, portanto, não teriam sido tão efetivas quanto as vacinas vivas atenuadas para o controle de LTI (GARCÍA; ZAVALA, 2019). Outra hipótese seria a latência ou persistência das estirpes vacinais, que podem ser reativadas em condições de estresse (WILLIAMS et al., 1992; FUCHS et al., 2007).

Em Guatapará, a maior taxa de detecção foi em 2010, no período sem a implementação da vacinação e com ocorrência de surtos de LTI na região. A vacina TCO foi introduzida em 2011 e, neste ano, houve uma redução para 20% na positividade, demonstrando a eficiência da vacina viva atenuada no controle da LTI, associada às medidas de biosseguridade implementadas (FARRA, 2014; ISHIZUKA et al., 2019; GARCÍA; ZAVALA, 2019). Em 2013, a detecção foi de 12,2%, coincidindo com a substituição da vacina TCO pelas vacinas recombinantes. Em 2017 e 2018, as taxas de detecção das amostras testadas foram de 21,7 e 16,3%, respectivamente.

As análises filogenéticas das amostras de Guatapará foram realizadas através do sequenciamento pelo método de Sanger, com os genes ICP4 (11 amostras) e TK (10 amostras), e também pelo sequenciamento NGS. Das 17 amostras submetidas ao NGS, obteve-se o genoma completo de uma amostra (IB8098) de 2010, além de sequências que possibilitaram analisar a filogenia dos genes ICP4 (4 amostras) e TK (3 amostras), incluindo a cepa vacinal CEO (estirpe Serva – Nobilis ILT). As onze sequências de ICP4 e do genoma completo agruparam-se no mesmo clado, juntamente com uma amostra (KJ028220) isolada em Guatapará, no ano de 2005, uma amostra (KJ028221) proveniente de Barretos (obtida em 2006), com identidade de 100%. Ambas as amostras (KJ028220 e KJ028221) foram classificadas como estirpes de campo relacionadas a Bastos (campo 2), conforme descrito por Chacón Villanueva (2008). Porém, as 11 sequências não foram agrupadas com amostras virulentas de campo, isoladas em 2003, 2004 e 2008, provenientes da região de Bastos, designadas como “campo 1” por Chacón Villanueva (2008). A árvore filogenética do gene ICP4 (região localizada entre os nucleotídeos 115319 e 115889 do VLTI), a partir das sequências de NGS de 4 amostras (IB17222, IB8096, IB8098, IB8088), agrupou-as com cepas de campo relacionadas à Bastos (GQ499353, GQ499355, KJ028227), isoladas em 2004, 2008

e 2011 (CHACON et al., 2015), além de uma amostra de campo (não vacinal) (FJ794468), isolada na região sul do país, em 2008 (CHACON; FERREIRA, 2009). Todas as amostras tiveram 100% de identidade entre si, exceto a amostra IB8098, cuja identidade foi de 99,8%. É interessante destacar que as análises filogenéticas de duas regiões, dentro do mesmo gene (ICP4), mostraram-se diferentes, alterando o agrupamento dessa mesma amostra em duas filogenias. Neste caso, além de alterar a posição da região do genoma do ICP4 analisada, a amostra IB 8098 foi submetida ao sequenciamento por Sanger e por NGS. Na figura 32, a amostra de Guatapar (IB8098 - Sanger) se agrupou em um clado diferente das amostras provenientes de Bastos (GQ499346, GQ499347, GQ499348, GQ499350, GQ499351, GQ499353, GQ499355 e FJ477380). Na figura 34, a amostra IB 8098 (NGS) agrupou-se no mesmo clado das seqncias citadas anteriormente. Uma hipótese seria de que, no sequenciamento por NGS, poderiam ocorrer alterações no comprimento das seqncias, o que certamente interferiria na construção das árvores filogenéticas. Piccirillo et al. (2016) descreveu diferenças encontradas no comprimento de cinco genomas completos do VLTI. Spatz et al. (2012) detectou um erro na montagem do genoma da estirpe Serva do VLTI (uma deleção de 1016 bp), que alterou o comprimento da seqncia obtida.

As análises filogenéticas relacionadas ao gene TK, que foram obtidas através do sequenciamento pelo método de Sanger, demonstraram um perfil de agrupamento diferente do obtido pelo ICP4, uma vez que das 10 amostras de Guatapar, nove agruparam com seqncias de cepas vacinais CEO, de origem Australiana (JN596963 e JN596962) e com estirpes de outros países (Suíça, Austrália, Rússia, Estados Unidos e China. A amostra IB1271-18 agrupou com seqncias de vacina TCO (JN580312) e 5 seqncias de vacinas CEO. Porém também agrupou com a estirpe virulenta do VLTI de Minas Gerais (KF86287), além de estirpes procedentes da ndia, Rússia, Turquia e China (Figura 33). A partir das seqncias do NGS, pôde-se realizar as análises filogenéticas para o gene TK de três amostras (IB8098, IB8088 e IB17236) de Guatapar, sendo que foram agrupadas com uma estirpe de campo (GQ499343), proveniente do sul do país (CHACON; FERREIRA, 2009).

Convém destacar que em todas as análises filogenéticas envolvendo o gene TK do VLTI, as amostras de vacinas vivas atenuadas CEO e TCO foram agrupadas em um mesmo ramo, de modo que não puderam ser diferenciadas (Figuras 33 e

35). Em contrapartida, as análises filogenéticas com o gene ICP4 foram capazes de discriminar estirpes vacinais CEO, TCO e amostras virulentas em ramos distintos (Figuras 32 e 34). Resultados similares foram descritos por diversos autores (CHACON; MIZUMA; PIANTINO FERREIRA, 2010; CHACON et al., 2015; COUTO et al., 2015). Outros autores utilizaram somente o gene ICP4 para o sequenciamento, possibilitando análises filogenéticas capazes de diferenciar estirpes vacinais CEO, TCO e amostras de campo em ramos distintos (CHACON; FERREIRA, 2009; PARRA et al., 2015).

Diferenças entre análises filogenéticas de mesmas amostras, submetidas ao sequenciamento, porém com genes diferentes, já foram descritas por Bayoumi e colaboradores (2020), onde as análises filogenéticas obtidas dos genes ICP4 e gJ do VLTI agruparam as amostras de maneiras diferentes.

Uma possível explicação para a detecção do VLTI nas regiões analisadas seria que as medidas de controle não teriam sido suficientes para a erradicação do vírus devido a alguns fatores intrínsecos relacionados à circulação. A elevada densidade populacional de aves, propriedades com lotes de idades múltiplas, além de baixas condições de biossegurança, tais como ocorrem nas áreas de produção de postura comercial das regiões deste estudo, contribuem para a ocorrência de surtos de LTI em várias partes do mundo (GOWTHAMAN et al., 2020). Além disto, casos esporádicos de LTI podem ocorrer devido ao manejo vacinal inadequado: seja por erros na aplicação das vacinas ou por falhas nas medidas de biossegurança. Em granjas com idades múltiplas, lotes vacinados inadequadamente podem levar a exposição do VLTI, durante a introdução de lotes mais jovens previamente vacinados (HIDALGO, 2003).

Finalmente, no presente estudo, foi sequenciado pela primeira vez no Brasil, um genoma completo do VLTI, através da técnica de NGS. A amostra IB8098 foi coletada em 2010, sendo proveniente de um lote de aves de recria de postura comercial localizado em Guatapará. O genoma completo gerou uma sequência de 152985 pares de base, com uma cobertura de 99,8%, com um total de 4755 leituras.

A análise filogenética, obtida a partir do genoma completo, agrupou a amostra IB8098 com a estirpe de campo russa (MF405079), com uma identidade de 99,90% entre ambas. Esta identidade entre as duas amostras também foi comprovada nas análises filogenéticas realizadas a partir das sequências do gene TK, obtidas pelo método de Sanger (Figura 33). Em um estudo prévio, Spatz e colaboradores (2019)

desenvolveram um sistema de genotipificação com seis categorias: vacinal TCO, vacinal CEO, virulento “like” CEO, virulento “US” e virulento “US” de subsistência. Para tanto, utilizaram análises filogenéticas obtidas a partir de 27 genomas completos de estirpes do VLTI, baseados no sequenciamento MinION, correlacionando com os genótipos de PCR-RFLP, previamente publicado por Oldoni et al. (2008). A classificação dos genótipos sugerida pelos autores foi: genótipo I (estirpe USDA); genótipos II e III (vírus relacionados com a estirpe vacinal TCO); genótipos IV e V (vírus relacionados com a estirpe vacinal CEO); genótipos de VI a IX (isolados de campo).

A partir da análise dos genótipos, proposta por Spatz et al. (2019), realizamos uma comparação entre as árvores filogenéticas, obtidas nesta publicação, e a obtida da sequência do genoma completo da amostra IB8098 (Figura 36). Tal filogenia continha 26, das 27 sequências utilizadas nesta publicação. Os agrupamentos foram semelhantes em ambas as filogenias. Baseado nesta classificação e nas análises filogenéticas realizadas com a amostra IB8098, a mesma se enquadrou no grupamento VII, VIII e IX, sendo compatível com isolados de campo selvagens virulentos.

O presente estudo confirma a circulação de estirpes de VLTI virulentas na região de Guatapará antes da implementação da vacinação em 2010. A caracterização molecular é capaz de ampliar a compreensão da virulência de agentes virais e sua circulação no decorrer do tempo e em áreas determinadas, dando subsídios aos programas de controle e prevenção de importantes enfermidades na avicultura industrial. A continuidade do monitoramento na região para a identificação de estirpes do VLTI e o acompanhamento da vacinação é fundamental para as medidas de controle da LTI na região.

7 CONCLUSÕES

Nosso estudo não detectou os vírus que causam a IA e a DNC pelos testes de RRT-PCR específicos para a detecção destes agentes em nenhuma das amostras de aves de subsistência localizadas no raio nas propriedades avícolas de reprodutoras. Estes achados reiteram o status sanitário como livre de influenza aviária e ausente para a DNC nas regiões avaliadas e no período considerado.

As técnicas de PCR em tempo real e convencional para detecção de VIA, VDNC e VLTI foram validadas e padronizadas, sendo que cada método diagnóstico apresentou desempenho satisfatório e resultados confiáveis.

Nosso estudo também mostrou que o VLTI ainda está presente nas regiões de Bastos e Guatapar, apesar das medidas de controle e vacinao vigentes. Os programas de vacinao nas regioes quarentenadas diminuíram a circulao do vírus com um leve aumento da deteco do VLTI com a utilizao apenas das vacinas recombinantes.

Foram encontradas diferenças entre as análises filogenéticas dos genes ICP4 e TK, sendo que os dados de ICP4 permitiram discriminar estirpes vacinais CEO, TCO e de campo, enquanto que TK permitiu apenas discriminar estirpes vacinais (CEO e TCO) das estirpes de campo. As sequências das amostras de Bastos foram relacionadas com cepas vacinais (CEO e TCO), condizentes com as vacinas utilizadas na região. Já as sequências do gene ICP4 de amostras de Guatapar foram agrupadas com sequências do VLTI virulento, detectadas em 2005 na mesma região.

As análises filogenéticas do genoma completo de uma amostra do VLTI circulante em Guatapar antes da implementao da vacinao foi convergente com as análises filogenéticas baseadas nos genes ICP4 e TK separando este vírus virulento das estirpes vacinais. Esse é o primeiro relato da obteno do genoma completo de VLTI no Brasil e sua caracterizao genômica desde o início da circulao do vírus na região há pelo menos dez anos. O monitoramento contínuo em aves é essencial para auxiliar as aoes da defesa agropecuária, avaliar as medidas de vacinao implementadas contribuindo para a melhoria da sanidade avícola.

8 REFERÊNCIAS

ABDELWHAB, E.-S. M.; VEITS, J.; METTENLEITER, T. C. Genetic changes that accompanied shifts of low pathogenic avian influenza viruses toward higher pathogenicity in poultry. **Virulence**, v. 4, n. 6, p. 441-452, 2013.

ABDISA, T.; TAGESU, T. Review on Newcastle disease of poultry and its public health importance. **J. Vet. Sci. Technol**, v. 8, n. 441, p. 2, 2017.

ABPA – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL. Relatório Anual - 2020. São Paulo, 2020. 160p. Disponível em: < http://abpa-br.org/wpcontent/uploads/2020/05/abpa_relatorio_anual_2020_portugues_web.pdf>. Acesso em 15 out. 2020.

ALDOUS, E.; MYNN, J.; BANKS, J.; ALEXANDER, D. A molecular epidemiological study of avian paramyxovirus type 1 (Newcastle disease virus) isolates by phylogenetic analysis of a partial nucleotide sequence of the fusion protein gene. **Avian Pathology**, v. 32, n. 3, p. 237-255, 2003.

ALDOUS, E. W.; ALEXANDER, D. J. Detection and differentiation of Newcastle disease virus (avian paramyxovirus type 1). **Avian Pathol**, v. 30, n. 2, p. 117-128, 2001.

ALEXANDER, D. J. Newcastle disease virus and other avian paramyxoviruses. In: Swayne, D. E. (Ed.). **A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens**. Kennett Square, PA: The American Association of Avian Pathologists, 1998, p.156–163.

ALEXANDER, D. J. Newcastle disease and other avian paramyxoviruses. **Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties**, v. 19, n. 2, p. 443-455, 2000.

ALEXANDER D. J.; SENNE, D. A. Newcastle disease, other avian paramyxoviruses and pneumovirus infections. In: Saif, Y. M.; Fadly, A.; Glisson J.R.; Mc D; Larry R.; Nolan, L. K., Swayne, D.(Eds.). **Diseases of poultry**. 12 ed. Ames: Blackwell, 2008, p. 750–798.

ALEXANDER, D. J. Newcastle disease in the European Union 2000 to 2009. **Avian Pathol**, v. 40, n. 6, p. 547-558, 2011.

ALTMÜLLER, A.; KUNERL, M.; MÜLLER, K.; HINSHAW, V. S.; FITCH, W. M.; SCHOLTISSEK, C. Genetic relatedness of the nucleoprotein (NP) of recent swine, turkey, and human influenza A virus(H1N1) isolates. **Virus Research**, v. 22, n. 1, p. 79-87, 1992.

AMARASINGHE, G. K.; AYLLÓN, M. A.; BÀO, Y.; BASLER, C. F.; BAVARI, S.; BLASDELL, K. R.; BRIESE, T.; BROWN, P. A.; BUKREYEV, A.; BALKEMABUSCHMANN, A. Taxonomy of the order Mononegavirales: update 2019. **Archives of virology**, v. 164, n. 7, p. 1967-1980, 2019.

ARAUJO, J.; PETRY, M. V.; FABRIZIO, T.; WALKER, D.; OMETTO, T.; THOMAZELLI, L. M.; SCHERER, A. L.; SERAFINI, P. P.; NETO, I. S.; KRAUSS, S.; WEBSTER, R. G.; WEBBY, R. J.; DURIGON, E. L. Migratory birds in southern Brazil are a source of multiple avian influenza virus subtypes. **Influenza Other Respir Viruses**, v. 12, n. 2, p. 220-231, 2018.

ARAÚJO, L. **Estudo sobre um foco de laringotraqueite infecciosa das galinhas do município de Petropolis/RJ; características fundamentais da doença e do vírus**: PESAGRO-RIO, 1982

ARYAL, S. **16 differences Between Antigenic Shift and Antigenic Drift**, 2018. Disponível em: <<https://microbenotes.com/differences-between-antigenic-shift-and-antigenic-drift/>>. Acesso em: 11 mai. 2020.

AYALA, A. J. Presence of vaccine-derived Newcastle disease viruses in wild birds. **PloS one**, v. 11, n. 9, p. e0162484, 2016.

BAGUST, T.; JONES, R.; GUY, J. Avian infectious laryngotracheitis. **Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties**, v. 19, n. 2, p. 483-488, 2000.

BAGUST, T. J. Laryngotracheitis (Gallid-1) herpesvirus infection in the chicken. 4. Latency establishment by wild and vaccine strains of ILT virus. **Avian Pathol**, v. 15, n. 3, p. 581-595, 1986.

BAUTISTA, D. Isolation of infectious laryngotracheitis virus (ILTV) from peafowls and chickens with a history of respiratory diseases. **Proceeding 140th AVMA Annu Conv**, v., n., p. 24, 2003.

BAYOUMI, M.; EL-SAIED, M.; AMER, H.; BASTAMI, M.; SAKR, E. E.; EL-MAHDY, M. Molecular characterization and genetic diversity of the infectious laryngotracheitis virus strains circulating in Egypt during the outbreaks of 2018 and 2019. **Archives of virology**, v. 165, n. 3, p. 661-670, 2020.

BECK, P. Bastos dá mais um passo rumo à excelência na produção de ovos.2019. Disponível em: <<https://avicultura.info/pt-br/bastos-excelencia-producao-de-ovos/>>. Acesso em: 10 de dez. 2020.

BELTRÁN, G.; WILLIAMS, S. M.; ZAVALA, G.; GUY, J. S.; GARCÍA, M. The route of inoculation dictates the replication patterns of the infectious laryngotracheitis virus (ILTV) pathogenic strain and chicken embryo origin (CEO) vaccine. **Avian Pathology**, v. 46, n. 6, p. 585-593, 2017.

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

BLAKEY, J.; STOUTE, S.; CROSSLEY, B.; METE, A. Retrospective analysis of infectious laryngotracheitis in backyard chicken flocks in California, 2007–2017, and determination of strain origin by partial ICP4 sequencing. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 31, n. 3, p. 350-358, 2019.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Portaria n. 193, de 19 de setembro de 1994. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 22 set. 1994, Seção 1, p. 14309.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução normativa n. 32, de 13 de maio de 2002. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 14 mai. 2002, Seção 1, p. 28.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução normativa n. 17, de 07 de abril de 2006. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 10 abr. 2006, Seção 1, p. 6.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Saúde Animal. **Ofício circular n. 7**, de 24 de janeiro de 2007. Brasília: MAPA, 2007a. Disponível em: <<http://www.cidasc.sc.gov.br/defesasanimais/files/2013/03/OFICIOCIRCULAR-07-2007-DSA.pdf>>. Acesso em: 04 mai. 2020.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Saúde Animal. **Ofício circular n. 157**, de 30 de outubro de 2007. Brasília: MAPA, 2007b. Disponível em: <http://www.idaron.ro.gov.br/wpcontent/uploads/2018/10/Oficio_Circular_157-2007.pdf>. Acesso em: 04 mai. 2020.

BRASIL. Nota Técnica DSA n ° 91 de 17 de dezembro de 2010. **Ocorrência de laringotraqueite infecciosa nos municípios de Itanhandu, Itamonte, Pouso Alto, Passa Quatro e Pedralva, região sul do estado de Minas Gerais**, 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Saúde Animal. **Norma interna DSA n° 03**, de 03 de outubro de 2011. Brasília: MAPA, 2011. Disponível em: < <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/saudeanimal/programas-de-saudeanimal/pnsa/imagens/NormalInternaDSAn0303.10.11StatussanitarioavicolaindustrialparaIAeDNC.pdf>>. Acesso em: 20 nov. 2020.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Coordenação de Sanidade Avícola. **Nota técnica CSA n° 16/2012**, de 08 de outubro de 2012. Brasília: MAPA, 2012a. Disponível em: < <http://www.adaf.am.gov.br/wp-content/uploads/2020/10/11.-Nota-T%C3%A9cnicaCSA-n%C2%BA-16-de-8-de-outubro-de-2012-%E2%80%93-Estabelece-osprocedimentos-de-vigil%C3%A2ncia-epidemiol%C3%B3gica-para-influenzaavi%C3%A1ria-IA-e-doe.pdf>>. Acesso em: 23 nov. 2020.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Informativo PNSA nº 4**, de 27 de dezembro de 2012b. Brasília: MAPA, 2012b. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/saudeanimal/programas-de-saudeanimal/pnsa/imagens/InformativoPNSA4Reconhecimentositiosdeavesmigratorias.pdf>>. Acesso em: 20 nov. 2020.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Plano de contingência para Influenza aviária e doença de Newcastle**. Versão 1.4. Brasília: MAPA, 2013a, 59 p. Disponível em: <https://www.defesa.agricultura.sp.gov.br/influenza-aviaria/plano-decontingencia/Plano-de-Contingencia-Versao-1_4.pdf>. Acesso em: 25 ago. 2020.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução normativa n. 50, de 24 de setembro de 2013. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 25 set. 2013b, Seção 1, p. 47.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução normativa n. 21, de 21 de outubro de 2014. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 22 out. 2014, Seção 1, p. 4.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Saúde Animal. **Memorando circular n. 72**, de 11 de dezembro de 2018. Brasília: MAPA, 2018. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/ptbr/assuntos/saude-animal-e-vegetal/saude-animal/programas-de-saudeanimal/pnsa/imagens/MEMOLTI.pdf>>. Acesso em 13 de abr. 2020.

BRIAND, F.-X.; SCHMITZ, A.; OGOR, K.; LE PRIOUX, A.; GUILLOU-CLOAREC, C.; GUILLEMOTO, C.; ALLÉE, C.; LE BRAS, M.-O.; HIRCHAUD, E.; QUENAULT, H. Emerging highly pathogenic H5 avian influenza viruses in France during winter 2015/16: phylogenetic analyses and markers for zoonotic potential. **Eurosurveillance**, v. 22, n. 9, p. 30473, 2017.

BROOKES, S. M.; IRVINE, R. M.; NUNEZ, A.; CLIFFORD, D.; ESSEN, S.; BROWN, I. H.; VAN REETH, K.; KUNTZ-SIMON, G.; LOEFFEN, W.; FONI, E.; LARSEN, L.; MATROSOVICH, M.; BUBLLOT, M.; MALDONADO, J.; BEER, M.; CATTOLI, G. Influenza A (H1N1) infection in pigs. **Vet Rec**, v. 164, n. 24, p. 760-761, 2009.

BROWN, E. Influenza virus genetics. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 54, n. 4, p. 196-209, 2000.

BUCHALA, F. G. **Planejamento, implantação e administração de medidas de defesa sanitária animal para o controle da laringotraqueíte infecciosa aviária, de 2002 a 2006, na região de Bastos, estado de São Paulo, Brasil**. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP, Campus de Jaboticabal, Jaboticabal, 2008. 157 p.

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

CALLISON, S. A.; RIBLET, S. M.; RODRÍGUEZ-AVILA, A.; GARCÍA, M. Reverse restriction fragment length polymorphism (RRFLP): A novel technique for genotyping infectious laryngotracheitis virus (ILTV) live attenuated vaccines. **Journal of Virological Methods**, v. 160, n. 1, p. 119-124, 2009.

CAPUA, I.; MUTINELLI, F.; MARANGON, S.; ALEXANDER, D. J. H7N1 avian influenza in Italy (1999 to 2000) in intensively reared chickens and turkeys. **Avian Pathol**, v. 29, n. 6, p. 537-543, 2000.

CAPUA, I.; MARANGON, S.; CANCELLOTTI, F. The 1999–2000 avian influenza (H7N1) epidemic in Italy. **Veterinary Research Communications**, v. 27, n. 1, p. 123-127, 2003.

CAPUA, I.; ALEXANDER, D. J. Human Health Implications of Avian Influenza Viruses and Paramyxoviruses. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 23, n. 1, p. 1-6, 2004.

CARVALHO, R. A. D. **Avaliação de método de sequenciamento de nova geração no diagnóstico genético de neoplasia endócrina múltipla tipo 1.** (Dissertação de mestrado). Faculdade de Medicina Universidade de São Paulo. São Paulo, 2016. 87 p.

CATTOLI, G.; FUSARO, A.; MONNE, I.; MOLIA, S.; LE MENACH, A.; MAREGEYA, B.; NCHARE, A.; BANGANA, I.; MAINA, A. G.; KOFFI, J. N.; THIAM, H.; BEZEID, O. E.; SALVIATO, A.; NISI, R.; TERREGINO, C.; CAPUA, I. Emergence of a new genetic lineage of Newcastle disease virus in West and Central Africa - implications for diagnosis and control. **Vet Microbiol**, v. 142, n. 3-4, p. 168-176, 2010.

CEVA. Lista de produtos. Disponível em: <<https://www.ceva.com.br/Produtos/Lista-de-Produtos/VECTORMUNE-FP-LT-AE>>. Acesso em: 16 nov. 2020.

CH, J. N.; HE, B.; LI, C.; ZHANG, X.; WU, W.; YIN, X.; FAN, B.; FAN, X.; WANG, J. Real-time RT-PCR for H5N1 avian influenza A virus detection. **Journal of medical microbiology**, v. 56, n., p. 603-607, 2007.

CHACÓN, J.; BRANDÃO, P.; VILLARREAL, L.; GAMA, N.; FERREIRA, A. J. P. Survey of infectious laryngotracheitis outbreak in layer hens and differential diagnosis with other respiratory pathogens. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 9, n. 1, p. 61-67, 2007.

CHACÓN VILLANUEVA, J. L. **Epidemiologia molecular do vírus de laringotraqueíte infecciosa isolados de surtos em poedeiras comerciais no Estado de São Paulo.** Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008. 110 p.

CHACÓN, J. L.; FERREIRA, A. J. P. Development and validation of nested-PCR for the diagnosis of clinical and subclinical infectious laryngotracheitis. **Journal of Virological Methods**, v. 151, n. 2, p. 188-193, 2008.

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

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

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

CHAN, C.-H.; LIN, K.-L.; CHAN, Y.; WANG, Y.-L.; CHI, Y.-T.; TU, H.-L.; SHIEH, H.-K.; LIU, W.-T. Amplification of the entire genome of influenza A virus H1N1 and H3N2 subtypes by reverse-transcription polymerase chain reaction. **Journal of Virological Methods**, v. 136, n. 1-2, p. 38-43, 2006.

CHEN, G. W.; CHANG, S. C.; MOK, C. K.; LO, Y. L.; KUNG, Y. N.; HUANG, J. H.; SHIH, Y. H.; WANG, J. Y.; CHIANG, C.; CHEN, C. J.; SHIH, S. R. Genomic signatures of human versus avian influenza A viruses. **Emerg Infect Dis**, v. 12, n. 9, p. 1353-1360, 2006.

CHEN, W.; CALVO, P. A.; MALIDE, D.; GIBBS, J.; SCHUBERT, U.; BACIK, I.; BASTA, S.; O'NEILL, R.; SCHICKLI, J.; PALESE, P. A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. **Nature medicine**, v. 7, n. 12, p. 1306-1312, 2001.

CHEN, W.; HE, B.; LI, C.; ZHANG, X.; WU, W.; YIN, X.; FAN, B.; FAN, X.; WANG, J. Real-time RT-PCR for H5N1 avian influenza A virus detection. **Journal of medical microbiology**, v. 56, n. 5, p. 603-607, 2007.

CHEN, Y.; XU, F.; FAN, X.; LUO, H.; GE, S.; ZHENG, Q.; XIA, N.; CHEN, H.; GUAN, Y.; ZHANG, J. Evaluation of a rapid test for detection of H5N1 avian influenza virus. **Journal of Virological Methods**, v. 154, n. 1-2, p. 213-215, 2008.

CLANCY, S. Genetics of the influenza virus. **Nature Education**, v. 1, n. 1, p. 83, 2008.

COLLINS, M.; STRONG, I.; ALEXANDER, D. Pathogenicity and phylogenetic evaluation of the variant Newcastle disease viruses termed "pigeon PMV-1 viruses" based on the nucleotide sequence of the fusion protein gene. **Archives of virology**, v. 141, n. 3-4, p. 635-647, 1996.

COPPO, M. J. C.; HARTLEY, C. A.; DEVLIN, J. M. Immune responses to infectious laryngotracheitis virus. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 41, n. 3, p. 454-462, 2013.

CORNAX, I.; MILLER, P. J.; AFONSO, C. L. Characterization of live LaSota vaccine strain-induced protection in chickens upon early challenge with a virulent Newcastle disease virus of heterologous genotype. **Avian Dis**, v. 56, n. 3, p. 464-470, 2012.

COUTO, R. D.; PREIS, I. S.; BRAGA, J. F. V.; BRASIL, B. S. A. F.; DRUMMOND, M. G.; MARTINS, N. R. D.; ECCO, R. Molecular characterization of infectious laryngotracheitis virus in naturally infected egg layer chickens in a multi-age flock in Brazil. **Archives of virology**, v. 160, n. 1, p. 241-252, 2015.

CRAWSHAW, G. J.; BOYCOTT, B. R. Infectious Laryngotracheitis in Peafowl and Pheasants. **Avian Diseases**, v. 26, n. 2, p. 397-401, 1982.

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

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

CZEGLEDI, A.; UJVARI, D.; SOMOGYI, E.; WEHMANN, E.; WERNER, O.; LOMNICZI, B. Third genome size category of avian paramyxovirus serotype 1 (Newcastle disease virus) and evolutionary implications. **Virus Res**, v. 120, n. 1-2, p. 36-48, 2006.

DANKAR, S. K.; MIRANDA, E.; FORBES, N. E.; PELCHAT, M.; TAVASSOLI, A.; SELMAN, M.; PING, J.; JIA, J.; BROWN, E. G. Influenza A/Hong Kong/156/1997 (H5N1) virus NS1 gene mutations F103L and M106I both increase IFN antagonism,

virulence and cytoplasmic localization but differ in binding to RIG-I and CPSF30. **Virology journal**, v. 10, n. 1, p. 1-23, 2013.

DARGATZ, D.; BEAM, A.; WAINWRIGHT, S.; MCCLUSKEY, B. Case Series of Turkey Farms from the H5N2 Highly Pathogenic Avian Influenza Outbreak in the United States During 2015. **Avian Diseases**, v. 60, n. 2, p. 467-472, 466, 2016.

DAVIDSON, I.; RAIBSHTEIN, I.; ALTORI, A.; ELKIN, N. Infectious laryngotracheitis virus (ILTV) vaccine intake evaluation by detection of virus amplification in feather pulps of vaccinated chickens. **Vaccine**, v. 34, n. 13, p. 1630-1633, 2016.

DAVISON, A. J. Herpesvirus systematics. **Vet Microbiol**, v. 143, n. 1, p. 52-69, 2010.

DAVISON, S.; GINGERICH, E. N.; CASAVANT, S.; ECKROADE, R. J. Evaluation of the efficacy of a live fowlpox-vectored infectious laryngotracheitis/avian encephalomyelitis vaccine against ILT viral challenge. **Avian Diseases**, v. 50, n. 1, p. 50-54, 2006.

DE ARAUJO, J.; DE AZEVEDO, S. M., JR.; GAIDET, N.; HURTADO, R. F.; WALKER, D.; THOMAZELLI, L. M.; OMETTO, T.; SEIXAS, M. M.; RODRIGUES, R.; GALINDO, D. B.; DA SILVA, A. C.; RODRIGUES, A. M.; BOMFIM, L. L.; MOTA, M. A.; LARRAZABAL, M. E.; BRANCO, J. O.; SERAFINI, P.; NETO, I. S.; FRANKS, J.; WEBBY, R. J.; WEBSTER, R. G.; DURIGON, E. L. Avian influenza virus (H11N9) in migratory shorebirds wintering in the Amazon Region, Brazil. **PLOS ONE**, v. 9, n. 10, p. e110141, 2014.

DE SOUSA, R. L. M.; MONTASSIER, H. J.; PINTO, A. A. Detection and quantification of antibodies to Newcastle disease virus in ostrich and rhea sera using a liquid phase blocking enzyme-linked immunosorbent assay. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 7, n. 6, p. 940-944, 2000.

DEVLIN, J. M.; BROWNING, G. F.; HARTLEY, C. A.; KIRKPATRICK, N. C.; MAHMOUDIAN, A.; NOORMOHAMMADI, A. H.; GILKERSON, J. R. Glycoprotein G is a virulence factor in infectious laryngotracheitis virus. **Journal of General Virology**, v. 87, n. 10, p. 2839-2847, 2006.

DIAZ-SANCHEZ, S.; HANNING, I.; PENDLETON, S.; D'SOUZA, D. Next-generation sequencing: The future of molecular genetics in poultry production and food safety
1 Presented as part of the Next Generation Sequencing: Applications for Food Safety and Poultry Production Symposium at the Poultry Science Association's annual meeting in Athens, Georgia, July 10, 2012. **Poultry Science**, v. 92, n. 2, p. 562-572, 2013.

DIMITROV, K. M.; RAMEY, A. M.; QIU, X.; BAHL, J.; AFONSO, C. L. Temporal, geographic, and host distribution of avian paramyxovirus 1 (Newcastle disease virus). **Infect Genet Evol**, v. 39, n., p. 22-34, 2016.

DIMITROV, K. M.; SHARMA, P.; VOLKENING, J. D.; GORAICHUK, I. V.; WAJID, A.; REHMANI, S. F.; BASHARAT, A.; SHITTU, I.; JOANNIS, T. M.; MILLER, P. J.; AFONSO, C. L. A robust and cost-effective approach to sequence and analyze complete genomes of small RNA viruses. **Virol J**, v. 14, n. 1, p. 72, 2017a.

DIMITROV, K. M.; AFONSO, C. L.; YU, Q.; MILLER, P. J. Newcastle disease vaccines-A solved problem or a continuous challenge? **Vet Microbiol**, v. 206, n., p. 126-136, 2017b.

DIMITROV, K. M.; ABOLNIK, C.; AFONSO, C. L.; ALBINA, E.; BAHL, J.; BERG, M.; BRIAND, F. X.; BROWN, I. H.; CHOI, K. S.; CHVALA, I.; DIEL, D. G.; DURR, P. A.; FERREIRA, H. L.; FUSARO, A.; GIL, P.; GOUJGOULOVA, G. V.; GRUND, C.; HICKS, J. T.; JOANNIS, T. M.; TORCHETTI, M. K.; KOLOSOV, S.; LAMBRECHT, B.; LEWIS, N. S.; LIU, H.; LIU, H.; MCCULLOUGH, S.; MILLER, P. J.; MONNE, I.; MULLER, C. P.; MUNIR, M.; REISCHAK, D.; SABRA, M.; SAMAL, S. K.; SERVAN DE ALMEIDA, R.; SHITTU, I.; SNOECK, C. J.; SUAREZ, D. L.; VAN BORM, S.; WANG, Z.; WONG, F. Y. K. Updated unified phylogenetic classification system and revised nomenclature for Newcastle disease virus. **Infect Genet Evol**, v. 74, n., p. 103917, 2019.

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

DUNDON, W. G.; HEIDARI, A.; FUSARO, A.; MONNE, I.; BEATO, M. S.; CATTOLI, G.; KOCH, G.; STARICK, E.; BROWN, I. H.; ALDOUS, E. W. Genetic data from avian influenza and avian paramyxoviruses generated by the European network of excellence (EPIZONE) between 2006 and 2011—review and recommendations for surveillance. **Veterinary microbiology**, v. 154, n. 3-4, p. 209-221, 2012.

ELBERS, A. R.; KOCH, G.; BOUMA, A. Performance of clinical signs in poultry for the detection of outbreaks during the avian influenza A (H7N7) epidemic in The Netherlands in 2003 **Avian Pathology**, v. 34, n. 3, p. 181-187, 2005.

ESAKI, M.; NOLAND, L.; EDDINS, T.; GODOY, A.; SAEKI, S.; SAITOH, S.; YASUDA, A.; DORSEY, K. M. Safety and efficacy of a turkey herpesvirus vector laryngotracheitis vaccine for chickens. **Avian Diseases**, v. 57, n. 2, p. 192-198, 2013.

FAKHRI, O.; HARTLEY, C. A.; DEVLIN, J. M.; BROWNING, G. F.; NOORMOHAMMADI, A. H.; LEE, S.-W. Development and application of high-resolution melting analysis for the classification of infectious laryngotracheitis virus strains and detection of recombinant progeny. **Archives of virology**, v. 164, n. 2, p. 427-438, 2019.

FAN, S.; DENG, G.; SONG, J.; TIAN, G.; SUO, Y.; JIANG, Y.; GUAN, Y.; BU, Z.; KAWAOKA, Y.; CHEN, H. Two amino acid residues in the matrix protein M1 contribute to the virulence difference of H5N1 avian influenza viruses in mice. **Virology**, v. 384, n. 1, p. 28-32, 2009.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Biosecurity for highly pathogenic avian influenza. **FAO Animal Production and Health Paper**, v. 165, n., p. 89, 2008.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. H7N9 situation update. Disponível em: <http://www.fao.org/ag/againfo/programmes/en/empres/H7N9/situation_update.html> p., 2019.

FARKAS, T.; SZÉKELY, E.; BELÁK, S.; KISS, I. Real-time PCR-based pathotyping of Newcastle disease virus by use of TaqMan minor groove binder probes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 7, p. 2114-2123, 2009.

FARRA, M. C. T. D. **Medidas de biosseguridade e controle da laringotraqueíte aviária nas granjas do município de Guatapar, estado de São Paulo**. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP, Campus de Jaboticabal, Jaboticabal, 2014. 47 p.

FELSENSTEIN, J. Confidence-Limits on Phylogenies - an Approach Using the Bootstrap. **Evolution**, v. 39, n. 4, p. 783-791, 1985.

FERNANDES, C. C.; VARANI, A. M.; LEMOS, E. G.; DE MIRANDA, V. F.; SILVA, K. R.; FERNANDO, F. S.; MONTASSIER, M. F.; MONTASSIER, H. J. Molecular and phylogenetic characterization based on the complete genome of a virulent pathotype of Newcastle disease virus isolated in the 1970s in Brazil. **Infect Genet Evol**, v. 26, p. 160-167, 2014.

FERRARI, M.; METTENLEITER, T. C.; ROMANELLI, M. G.; CABASSI, E.; CORRADI, A.; DAL MAS, N.; SILINI, R. A Comparative Study of Pseudorabies Virus (PRV) Strains with Defects in Thymidine Kinase and Glycoprotein Genes. **Journal of Comparative Pathology**, v. 123, n. 2-3, p. 152-163, 2000.

FERREIRA, H. L.; TAYLOR, T. L.; DIMITROV, K. M.; SABRA, M.; AFONSO, C. L.; SUAREZ, D. L. Virulent Newcastle disease viruses from chicken origin are more pathogenic and transmissible to chickens than viruses normally maintained in wild birds. **Veterinary microbiology**, v. 235, n., p. 25-34, 2019.

FERREIRA, H. L.; SUAREZ, D. L. SNP Analysis to Select Conserved Regions for an Improved Real-time RT-PCR Test specific for Newcastle Disease Virus. **Avian Dis**, v. In Press, n., p., 2019.

FERREIRA, H. L.; REILLEY, A. M.; GOLDENBERG, D.; ORTIZ, I. R. A.; GALLARDO, R. A.; SUAREZ, D. L. Protection conferred by commercial NDV live attenuated and double recombinant HVT vaccines against virulent California 2018 Newcastle disease virus (NDV) in chickens. **Vaccine**, v. 38, n. 34, p. 5507-5515, 2020.

FLORES, M. L.; SEGABINAZI, S. D.; SANTOS, H. F.; BASSAN, J. D. L. Epidemiologia da doença de Newcastle – Revisão bibliográfica. **A Hora Veterinária**, v. 26, n. 153, p. 57-61, 2006.

FOUCHIER, R. A. M.; BESTEBROER, T. M.; HERFST, S.; VAN DER KEMP, L.; RIMMELZWAAN, G. F.; OSTERHAUS, A. D. M. E. Detection of Influenza A Viruses from Different Species by PCR Amplification of Conserved Sequences in the Matrix Gene. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 11, p. 4096-4101, 2000.

FUCHS, W.; VEITS, J.; HELFERICH, D.; GRANZOW, H.; TEIFKE, J. P.; METTENLEITER, T. C. Molecular biology of avian infectious laryngotracheitis virus. **Vet Res**, v. 38, n. 2, p. 261-279, 2007.

FULLER, C. M.; BRODD, L.; IRVINE, R. M.; ALEXANDER, D. J.; ALDOUS, E. W. Development of an L gene real-time reverse-transcription PCR assay for the detection of avian paramyxovirus type 1 RNA in clinical samples. **Arch Virol**, v. 155, n. 6, p. 817-823, 2010.

GANAR, K.; DAS, M.; SINHA, S.; KUMAR, S. Newcastle disease virus: Current status and our understanding. **Virus Research**, v. 184, n., p. 71-81, 2014.

GARCIA, M.; CRAWFORD, J. M.; LATIMER, J. W.; RIVERA-CRUZ, E.; PERDUE, M. L. Heterogeneity in the haemagglutinin gene and emergence of the highly pathogenic phenotype among recent H5N2 avian influenza viruses from Mexico. **Journal of general Virology**, v. 77, n. 7, p. 1493-1504, 1996.

GARCIA, M.; SPATZ, S.; CHENG, Y.; RIBLET, S.; VOLKENING, J.; SCHNEIDERS, G. Attenuation and protection efficacy of ORF C gene-deleted recombinant of infectious laryngotracheitis virus. **Journal of General Virology**, v. 97, n. 9, p. 2352-2362, 2016.

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

GARCÍA, M. Current and future vaccines and vaccination strategies against infectious laryngotracheitis (ILT) respiratory disease of poultry. **Veterinary Microbiology**, v. 206, n., p. 157-162, 2017.

GARCÍA, M.; SPATZ, S.; GUY, J. S. Infectious Laryngotracheitis. In: Swayne, D. (Ed.). **Diseases of Poultry**. Ames, IA.: John Wiley & Sons, Inc., 2013, p.161-179.

GARCÍA, M.; ZAVALA, G. Commercial vaccines and vaccination strategies against infectious Laryngotracheitis: What we have learned and knowledge gaps that remain. **Avian Diseases**, v. 63, n. 2, p. 325-334, 2019.

GARTEN, W.; KLENK, H.-D. Cleavage activation of the influenza virus hemagglutinin and its role in pathogenesis. In: (Ed.). **Avian influenza**: Karger Publishers, 2008. v.27, p.156-167.

GODOY, A.; ICARD, A.; MARTINEZ, M.; MASHCHENKO, A.; GARCIA, M.; EL-ATTRACHE, J. Detection of Infectious Laryngotracheitis Virus Antibodies by Glycoprotein-Specific ELISAs in Chickens Vaccinated with Viral Vector Vaccines. **Avian Diseases**, v. 57, n. 2, p. 432-436, 2013.

GOWTHAMAN, V.; SINGH, S. D.; DHAMA, K.; SRINIVASAN, P.; SARAVANAN, S.; GOPALA KRISHNA MURTHY, T. R.; RAMAKRISHNAN, M. A. Molecular Survey of Respiratory and Immunosuppressive Pathogens Associated with Low Pathogenic Avian Influenza H9N2 Subtype and Virulent Newcastle Disease Viruses in Commercial Chicken Flocks. **The Journal of Poultry Science**, v. 54, n. 2, p. 179-184, 2017.

GOWTHAMAN, V.; KUMAR, S.; KOUL, M.; DAVE, U.; MURTHY, T. G. K.; MUNUSWAMY, P.; TIWARI, R.; KARTHIK, K.; DHAMA, K.; MICHALAK, I. Infectious laryngotracheitis: Etiology, epidemiology, pathobiology, and advances in diagnosis and control—a comprehensive review. **Veterinary Quarterly**, v. 40, n. 1, p. 140-161, 2020.

GUIMARÃES, M. B.; HURTADO, R.; BELLO, C. P.; VANSTREELS, R. E. T.; FERREIRA, A. J. P. Surveillance for Newcastle Disease Virus, Avian Influenza Virus and Mycoplasma Gallisepticum in Wild Birds Near Commercial Poultry Farms Surrounded by Atlantic Rainforest Remnants, Southeastern Brazil. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 18, n. 3, p. 387-394, 2016.

GUY, J. S.; BARNES, H. J.; MORGAN, L. M. Virulence of infectious laryngotracheitis viruses: comparison of modified-live vaccine viruses and North Carolina field isolates. **Avian Diseases**, v., n., p. 106-113, 1990.

GUY, J. S.; BARNES, H. J.; SMITH, L. Increased virulence of modified-live infectious laryngotracheitis vaccine virus following bird-to-bird passage. **Avian Dis**, v. 35, n. 2, p. 348-355, 1991.

GUY, J. S.; GARCIA, M. Laryngotracheitis. In: Y.M., S., Fadly, A. M., *et al* (Ed.). **Diseases of Poultry**. Ames: Blackwell Publishing, 2008. v.1, p.137-152.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, n., p. 95-98, 1999.

HASEGAWA, M.; KISHINO, H.; YANO, T.-A. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. **Journal of molecular evolution**, v. 22, n. 2, p. 160-174, 1985.

HATTA, M.; GAO, P.; HALFMANN, P.; KAWAOKA, Y. Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 influenza A viruses. **Science**, v. 293, n. 5536, p. 1840-1842, 2001.

HÄUSLAIGNER, R.; SONNENBURG, J.; KOTHLOW, S.; KASPERS, B.; STAUBACH, C.; GRUND, C. Evaluation of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay to study the specific humoral immune response of Muscovy ducks (*Cairina moschata*) and domestic geese (*Anser anser* var. *domestica*) after vaccination against Newcastle disease virus. **Avian Pathology**, v. 38, n. 2, p. 89-95, 2009.

HEATHER, J. M.; CHAIN, B. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. **Genomics**, v. 107, n. 1, p. 1-8, 2016.

HEIN, R.; SLACUM, G.; LYNCH, P.; HONEGGER, K. Recombinant HVT/LT vaccine (Innovax-ILT) field application issues. In: **Proc. 43rd National Meeting on Poultry Health and Processing**, Ocean City, MD, 2008, p. 73-74.

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

HIPÓLITO, O.; SOARES, L. A.; PEREIRA, O. A. C.; PINTO, A. A.; BOTTINO, J. A. Isolamento e identificação do vírus da Laringotraqueíte infecciosa das galinhas no Brasil. In: **Congresso Brasileiro de Microbiologia**, 1974, Rio de Janeiro, p. 116.

HOOPER, P.; SELLECK, P.; SWAYNE, D. E.; SLEMONS, R. D. Pathology of low and high virulent influenza virus infections. In: Swayne, D.E and Slemons, R.D. Slemons (ed.). **Proceedings of the Fourth International Symposium on Avian Influenza of the US Animal Health Association**, Richmond, VA.1998. p.131-141.

HULSE-POST, D. J.; FRANKS, J.; BOYD, K.; SALOMON, R.; HOFFMANN, E.; YEN, H. L.; WEBBY, R. J.; WALKER, D.; NGUYEN, T. D.; WEBSTER, R. G. Molecular changes in the polymerase genes (PA and PB1) associated with high pathogenicity of H5N1 influenza virus in mallard ducks. **J Virol**, v. 81, n. 16, p. 8515-8524, 2007.

HURTADO, R.; FABRIZIO, T.; VANSTREELS, R. E.; KRAUSS, S.; WEBBY, R. J.; WEBSTER, R. G.; DURIGON, E. L. Molecular Characterization of Subtype H11N9 Avian Influenza Virus Isolated from Shorebirds in Brazil. **PLoS One**, v. 10, n. 12, p. e0145627, 2015.

ICTV - INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES, 2019. Disponível em:< <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>>. Acesso em: 20 nov. 2020.

ISHIZUKA, M. M. **Epidemiologia e profilaxia da laringotraqueíte infecciosa das aves: história natural da doença**. Campinas, SP: Mundo Agro Editora Ltda., 2019. 50 p.

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

JENNELLE, C. S.; CARSTENSEN, M.; HILDEBRAND, E. C.; WOLF, P. C.; GREAR, D. A.; IP, H. S.; CORNICELLI, L. Surveillance for Highly Pathogenic Avian Influenza in Wild Turkeys (*Meleagris gallopavo*) of Minnesota, USA during 2015 Outbreaks in Domestic Poultry. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 53, n. 3, p. 616-620, 2017.

JIAO, P.; TIAN, G.; LI, Y.; DENG, G.; JIANG, Y.; LIU, C.; LIU, W.; BU, Z.; KAWAOKA, Y.; CHEN, H. A single-amino-acid substitution in the NS1 protein changes the pathogenicity of H5N1 avian influenza viruses in mice. **J Virol**, v. 82, n. 3, p. 1146-1154, 2008.

JIMENEZ-BLUHM, P.; BRAVO-VASQUEZ, N.; TORCHETTI, M. K.; KILLIAN, M. L.; LIVINGSTON, B.; HERRERA, J.; FUENTES, M.; SCHULTZ-CHERRY, S.; HAMILTON-WEST, C. Low pathogenic avian influenza (H7N6) virus causing an outbreak in commercial Turkey farms in Chile. **Emerging Microbes & Infections**, v. 8, n. 1, p. 479-485, 2019.

JOHNSON, D. I.; VAGNOZZI, A.; DOREA, F.; RIBLET, S. M.; MUNDT, A.; ZAVALA, G.; GARCÍA, M. Protection against infectious laryngotracheitis by in ovo vaccination with commercially available viral vector recombinant vaccines. **Avian Diseases**, v. 54, n. 4, p. 1251-1259, 2010.

JOHNSON, M. A.; TYACK, S. G.; PRIDEAUX, C.; KONGSUWAN, K.; SHEPPARD, M. Nucleotide sequence of infectious laryngotracheitis virus (gallid herpesvirus 1) ICP4 gene. **Virus Research**, v. 35, n. 2, p. 193-204, 1995.

JONGES, M.; BATAILLE, A.; ENSERINK, R.; MEIJER, A.; FOUCHIER, R. A.; STEGEMAN, A.; KOCH, G.; KOOPMANS, M. Comparative analysis of avian influenza virus diversity in poultry and humans during a highly pathogenic avian influenza A (H7N7) virus outbreak. **Journal of Virology**, v. 85, n. 20, p. 10598-10604, 2011.

KALETA, E. F.; RÜLKE, C. P. A. The Beginning and Spread of Fowl Plague (H7 High Pathogenicity Avian Influenza) Across Europe and Asia (1878–1955). In: Swayne, D. (Ed.). **Avian Influenza**. Ames, Iowa: Blackwell Publishing Ltd, 2008, p.145-189.

KAPCZYNSKI, D. R.; KING, D. J. Protection of chickens against overt clinical disease and determination of viral shedding following vaccination with commercially available Newcastle disease virus vaccines upon challenge with highly virulent virus from the California 2002 exotic Newcastle disease outbreak. **Vaccine**, v. 23, n. 26, p. 3424-3433, 2005.

KAPCZYNSKI, D. R.; AFONSO, C. L.; MILLER, P. J. Immune responses of poultry to Newcastle disease virus. **Dev Comp Immunol**, v. 41, n. 3, p. 447-453, 2013.

KAPGATE, S. S.; BARBUDDHE, S. B.; KUMANAN, K. Next-generation sequencing technologies: Tool to study avian virus diversity. **Acta Virologica**, v. 59, n. 1, p. 3-13, 2015.

KARIITHI, H. M.; WELCH, C. N.; FERREIRA, H. L.; PUSCH, E. A.; ATEYA, L. O.; BINEPAL, Y. S.; APOPO, A. A.; DULU, T. D.; AFONSO, C. L.; SUAREZ, D. L. Genetic characterization and pathogenesis of the first H9N2 low pathogenic avian influenza viruses isolated from chickens in Kenyan live bird markets. **Infection, Genetics and evolution**, v. 78, n., p. 104074, 2020.

KHATUN, M.; ISLAM, S.; ERSHADUZZAMAN, M.; ISLAM, H.; YASMIN, S.; HOSEN, A.; HASAN, M. Economic Impact of Newcastle Disease on Village Chickens—A Case of Bangladesh. **Journal of Economics and Business**, v. 1, n. 3, p. 358-367, 2018.

KINDE, H.; UZAL, F.; HIETALA, S.; READ, D.; ARDANS, A.; OUANI, J.; BARR, B.; DAFT, B.; BLANCHARD, P.; MOORE, J.; MCFARLAND, M.; CHARLTON, B.; SHIVAPRASAD, H.; CHIN, R.; REZVANI, M.; SOMMER, F.; ZELLNER, D.; MOELLER, R.; ANDERSON, M.; WOODS, L.; PESAVANTO, P.; CORTES, P.; WOOLCOCK, P.; BREITMEYER, R.; CASTELLAN, D.; GARBER, L. P. The diagnosis of exotic Newcastle disease in southern California 200-2003. In: **46th Annual conference of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians**, 2003, San Diego.

KIRKPATRICK, N. C.; MAHMOUDIAN, A.; O'ROURKE, D.; NOORMOHAMMADI, A. H. Differentiation of infectious laryngotracheitis virus isolates by restriction fragment length polymorphic analysis of polymerase chain reaction products amplified from multiple genes. **Avian Dis**, v. 50, n. 1, p. 28-34, 2006.

KOMMERS, G. D.; KING, D. J.; SEAL, B. S.; BROWN, C. C. Virulence of pigeon-origin Newcastle disease virus isolates for domestic chickens. **Avian Dis**, v. 45, n. 4, p. 906-921, 2001.

KOMMERS, G. D.; KING, D. J.; SEAL, B. S.; CARMICHAEL, K. P.; BROWN, C. C. Pathogenesis of six pigeon-origin isolates of Newcastle disease virus for domestic chickens. **Vet Pathol**, v. 39, n. 3, p. 353-362, 2002.

KORNELIUSSEN, T. S.; ALBRECHTSEN, A.; NIELSEN, R. ANGSD: Analysis of Next Generation Sequencing Data. **BMC Bioinformatics**, v. 15, n. 1, p. 356, 2014.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. **Molecular Biology and Evolution**, v. 33, n. 7, p. 1870-1874, 2016.

KUMAR, V.; YADAV, K.; KUMAR, R.; CHAUDHARY, N.; KUMAR, S. Glycoprotein D peptide-based diagnostic approach for the detection of avian infectious laryngotracheitis antibodies. **Avian Pathology**, v. 48, n. 6, p. 602-609, 2019.

LACONI, A.; FORTIN, A.; BEDENDO, G.; SHIBATA, A.; SAKODA, Y.; AWUNI, J. A.; GO-MARO, E.; ARAFA, A.; MAKEN ALI, A. S.; TERREGINO, C.; MONNE, I. Detection of avian influenza virus: a comparative study of the in silico and in vitro performances of current RT-qPCR assays. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 8441, 2020.

LAMB, R. A.; PARKS, G. D. Paramyxoviridae: The viruses and their replication. In: Knipe, D. M., Howley, P. M., *et al* (Ed.). **Fields Virology**. New York: Lippincott Williams & Wilkins, 2007, p.1450 - 1496.

LEE, C.-W.; SENNE, D. A.; SUAREZ, D. L. Effect of vaccine use in the evolution of Mexican lineage H5N2 avian influenza virus. **Journal of Virology**, v. 78, n. 15, p. 8372-8381, 2004.

LEE, D.-H.; CRIADO, M. F.; SWAYNE, D. E. Pathobiological Origins and Evolutionary History of Highly Pathogenic Avian Influenza Viruses. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v., n., p. a038679, 2020.

LEE, D. H.; TORCHETTI, M. K.; KILLIAN, M. L.; SWAYNE, D. Deep sequencing of H7N8 avian influenza viruses from surveillance zone supports H7N8 high pathogenicity avian influenza was limited to a single outbreak farm in Indiana during 2016. **Virology**, v. 507, n., p. 216-219, 2017.

LEE, H. K.; TANG, J. W.-T.; KONG, D. H.-L.; KOAY, E. S.-C. Simplified large-scale Sanger genome sequencing for influenza A/H3N2 virus. **PLOS ONE**, v. 8, n. 5, p. e64785, 2013.

LEE, N.; LE SAGE, V.; NANNI, A. V.; SNYDER, D. J.; COOPER, V. S.; LAKDAWALA, S. S. Genome-wide analysis of influenza viral RNA and nucleoprotein association. **Nucleic acids research**, v. 45, n. 15, p. 8968-8977, 2017.

LEE, S.-W.; MARKHAM, P. F.; MARKHAM, J. F.; PETERMANN, I.; NOORMOHAMMADI, A. H.; BROWNING, G. F.; FICORILLI, N. P.; HARTLEY, C. A.; DEVLIN, J. M. First complete genome sequence of infectious laryngotracheitis virus. **BMC Genomics**, v. 12, n. 1, p. 197, 2011.

LEE, S. W.; MARKHAM, P. F.; COPPO, M. J. C.; LEGIONE, A. R.; MARKHAM, J. F.; NOORMOHAMMADI, A. H.; BROWNING, G. F.; FICORILLI, N.; HARTLEY, C. A.; DEVLIN, J. M. Attenuated Vaccines Can Recombine to Form Virulent Field Viruses. **Science**, v. 337, n. 6091, p. 188-188, 2012.

LESLIE, J. Newcastle disease: outbreak losses and control policy costs. **The Veterinary record**, v. 146, n. 21, p. 603-606, 2000.

LI, J.; LI, Y.; HU, Y.; CHANG, G.; SUN, W.; YANG, Y.; KANG, X.; WU, X.; ZHU, Q. PB1-mediated virulence attenuation of H5N1 influenza virus in mice is associated with PB2. **Journal of general Virology**, v. 92, n. 6, p. 1435-1444, 2011.

LI, Z.; CHEN, H.; JIAO, P.; DENG, G.; TIAN, G.; LI, Y.; HOFFMANN, E.; WEBSTER, R. G.; MATSUOKA, Y.; YU, K. Molecular basis of replication of duck H5N1 influenza viruses in a mammalian mouse model. **J Virol**, v. 79, n. 18, p. 12058-12064, 2005.

LIU, C. M.; WONG, T.; WU, E.; LUO, R.; YIU, S. M.; LI, Y.; WANG, B.; YU, C.; CHU, X.; ZHAO, K.; LI, R.; LAM, T. W. SOAP3: ultra-fast GPU-based parallel alignment tool for short reads. **Bioinformatics**, v. 28, n. 6, p. 878-879, 2012.

LIU, L.; LI, Y.; LI, S.; HU, N.; HE, Y.; PONG, R.; LIN, D.; LU, L.; LAW, M. Comparison of next-generation sequencing systems. **BioMed research international**, v. 2012, n., p., 2012.

LONCOMAN, C. A.; HARTLEY, C. A.; COPPO, M. J. C.; VAZ, P. K.; DIAZ-MENDEZ, A.; BROWNING, G. F.; GARCIA, M.; SPATZ, S.; DEVLIN, J. M. Genetic Diversity of Infectious Laryngotracheitis Virus during In Vivo Coinfection Parallels Viral Replication and Arises from Recombination Hot Spots within the Genome. **Appl Environ Microbiol**, v. 83, n. 23, p., 2017a.

LONCOMAN, C. A.; HARTLEY, C. A.; COPPO, M. J. C.; VAZ, P. K.; DIAZ-MÉNDEZ, A.; BROWNING, G. F.; LEE, S.-W.; DEVLIN, J. M. Development and application of a TaqMan single nucleotide polymorphism genotyping assay to study infectious laryngotracheitis virus recombination in the natural host. **PLOS ONE**, v. 12, n. 3, p. e0174590, 2017b.

LONCOMAN, C. A.; VAZ, P. K.; COPPO, M. J.; HARTLEY, C. A.; MORERA, F. J.; BROWNING, G. F.; DEVLIN, J. M. Natural recombination in alphaherpesviruses: Insights into viral evolution through full genome sequencing and sequence analysis. **Infect Genet Evol**, v. 49, n., p. 174-185, 2017.

LUCIANO, R. L.; BUIM, M. R.; DEL FAVA, C.; IKUNO, A. A.; HARAKAVA, R.; ISHIZUKA, M. M.; BUCHALA, F. G.; SOARES, N. M. Detection and characterization of infectious laryngotracheitis virus in an outbreak in laying hens from the state of Sao Paulo, Brazil. In: **Avian Respiratory Disease Conference**, 1., 2011, Athens, *Anais...*, Athens, 2011.

LUCIANO, R. L.; BUIM, M. R.; DEL FAVA, C.; IKUNO, A. A.; ISHIZUKA, M.; BUCHALA, F. G. Laboratory monitoring of infectious laryngotracheitis during an outbreak in commercial laying hens in the Guatapar region, before and after the introduction of tissue culture origin (TCO) vaccine In: **XXIV World's Poultry Congress**, 2012, Salvador, Bahia. *Anais...*, Salvador, 2012.

LUCIANO, R. L.; BUIM, M. R.; DEL FAVA, C.; HARAKAVA, R.; ISHIZUKA, M. M.; BUCHALA, F. G. Laringotraqueite infecciosa das aves: diagnóstico laboratorial, caracterizao viral e medidas de controle em um surto em aves de postura comercial no estado de São Paulo, Brasil. **Revista Ars Veterinaria – Revista de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 29, n. 4, p. 23, 2013.

MAEKAWA, D.; RIBLET, S. M.; NEWMAN, L.; KOOPMAN, R.; BARBOSA, T.; GARCÍA, M. Evaluation of vaccination against infectious laryngotracheitis (ILT) with recombinant herpesvirus of turkey (rHVT-LT) and chicken embryo origin (CEO) vaccines applied alone or in combination. **Avian Pathology**, v. 48, n. 6, p. 573-581, 2019.

MAHMOUDIAN, A.; KIRKPATRICK, N. C.; COPPO, M.; LEE, S.-W.; DEVLIN, J. M.; MARKHAM, P. F.; BROWNING, G. F.; NOORMOHAMMADI, A. H. Development of a SYBR Green quantitative polymerase chain reaction assay for rapid detection and quantification of infectious laryngotracheitis virus. **Avian pathology**, v. 40, n. 3, p. 237-242, 2011.

MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Estudo para avaliao de circulao dos vírus de influenza aviária e da doença de Newcastle em plantéis avícolas nacionais - Relatório Final. Brasília, DF, 2016. 82 p.

MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Ficha técnica:**

Influenza aviária (IA). Brasília: MAPA, 2020a. 5 p. Disponível em: <http://sistemasweb.agricultura.gov.br/pages/fichas_tecnicas/Ficha_Tecnica_INFLUENZA_AV_jan20.pdf>. Acesso em: 25 ago. 2020.

MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Ficha técnica:**

doença de Newcastle. Brasília: MAPA, 2020b. 6 p. Disponível em: <http://sistemasweb.agricultura.gov.br/pages/fichas_tecnicas/Ficha_Tecnica_INFLUENZA_AV_jan20.pdf>. Acesso em: 25 ago. 2020.

MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Ficha técnica:**

Laringotraqueíte infecciosa das aves (LTI). Brasília: MAPA, 2020c. 5 p. Disponível em: <<https://www.agricultura.rs.gov.br/upload/arquivos/202011/17163753-fichatecnica-lti-nov2020.pdf>>. Acesso em: 17 nov. 2020.

MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Manual de colheita, armazenamento e encaminhamento de amostras.** Brasília: MAPA, 2020d. 11 p. Disponível em: < https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/saude-animal/programas-de-saudeanimal/pnsa/imagens/Modelo_de_Manual_colheita_PNSA.versao_01.Final.pdf >. Acesso em 20 nov. 2020.

MARANGON, S.; CAPUA, I.; POZZA, G.; SANTUCCI, U. Field experiences in the control of avian influenza outbreaks in densely populated poultry areas. **Dev Biol (Basel)**, v. 119, n., p. 155-164, 2004.

MARGULIES, M.; EGHOLM, M.; ALTMAN, W. E.; ATTIYA, S.; BADER, J. S.; BEMBEN, L. A.; BERKA, J.; BRAVERMAN, M. S.; CHEN, Y.-J.; CHEN, Z.; DEWELL, S. B.; DU, L.; FIERRO, J. M.; GOMES, X. V.; GODWIN, B. C.; HE, W.; HELGESEN, S.; HO, C. H.; IRZYK, G. P.; JANDO, S. C.; ALENQUER, M. L. I.; JARVIE, T. P.; JIRAGE, K. B.; KIM, J.-B.; KNIGHT, J. R.; LANZA, J. R.; LEAMON, J. H.; LEFKOWITZ, S. M.; LEI, M.; LI, J.; LOHMAN, K. L.; LU, H.; MAKHIJANI, V. B.; MCDADE, K. E.; MCKENNA, M. P.; MYERS, E. W.; NICKERSON, E.; NOBILE, J. R.; PLANT, R.; PUC, B. P.; RONAN, M. T.; ROTH, G. T.; SARKIS, G. J.; SIMONS, J. F.; SIMPSON, J. W.; SRINIVASAN, M.; TARTARO, K. R.; TOMASZ, A.; VOGT, K. A.; VOLKMER, G. A.; WANG, S. H.; WANG, Y.; WEINER, M. P.; YU, P.; BEGLEY, R. F.; ROTHBERG, J. M. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. **Nature**, v. 437, n. 7057, p. 376-380, 2005.

MARKS, F. S.; RODENBUSCH, C. R.; OKINO, C. H.; HEIN, H. E.; COSTA, E. F.; MACHADO, G.; CANAL, C. W.; BRENTANO, L.; CORBELLINI, L. G. Targeted survey of Newcastle disease virus in backyard poultry flocks located in wintering site for migratory birds from Southern Brazil. **Prev Vet Med**, v. 116, n. 1-2, p. 197-202, 2014.

MENENDEZ, K. R.; GARCIA, M.; SPATZ, S.; TABLANTE, N. L. Molecular epidemiology of infectious laryngotracheitis: a review. **Avian Pathology**, v. 43, n. 2, p. 108-117, 2014.

MILLER, P. J.; KOCH, G. Newcastle Disease. In: Swayne, D. (Ed.). **Diseases of Poultry**. Ames, IA.: John Wiley & Sons, Inc., 2013, p.89-107; 120-130.

MILLER, P. J. **Newcastle Disease in Poultry (Avian pneumoencephalitis, Exotic or velogenic Newcastle disease)**, 2014. Disponível em: <<https://www.merckvetmanual.com/poultry/newcastle-disease-and-other-paramyxovirus-infections/newcastle-disease-in-poultry#:~:text=Newcastle%20disease%20is%20an%20infection,be%20the%20predominant%20clinical%20form>>. Acesso em: 19 out. 2020.

MORLEY, A. J.; THOMSON, D. K. Swollen head syndrome in broiler chickens. **Avian Diseases**, v. 28, n., p. 238-243, 1984.

MOTA, M. A.; LIMA, F. S.; OLIVEIRA, P. F. N.; GUIMARÃES, M. P. Ações de vigilância para influenza aviária desenvolvida no Brasil, no período de 2004 e 2007. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 65, n. 5, p. 1265-1273, 2013.

NADIMPALLI, M.; LEE, S.; DEVLIN, J.; GILKERSON, J.; HARTLEY, C. Impairment of infectious laryngotracheitis virus replication by deletion of the UL [-1] gene. **Archives of virology**, v. 162, n. 6, p. 1541-1548, 2017.

NIDZWORSKI, D.; RABALSKI, L.; GROMADZKA, B. Detection and differentiation of virulent and avirulent strains of Newcastle disease virus by real-time PCR. **Journal of Virological Methods**, v. 173, n. 1, p. 144-149, 2011.

OFFLU - OIE-FAO Network of Expertise on Avian Influenza. Disponível em: <<https://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/update-on-avian-influenza/2015/>>. Acesso em: 16 mar. 2020.

OIE – OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. Newcastle disease (infection with Newcastle disease virus). In: **Manual of diagnostics tests and vaccines for terrestrial animals**. Paris: OIE, 2012a. cap. 10.9. Disponível em: <https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahc/2018/en_chapitre_n_d.htm>. Acesso em: 23 mar. 2020.

OIE – OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. Newcastle disease (infection with Newcastle disease virus). In: **Manual of diagnostics tests and vaccines for terrestrial animals**. Paris: OIE, 2012b. cap. 3.3.14, p. 964-983. Disponível em: <https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.03.14_NEWCASTLE_DIS.pdf>. Acesso em: 23 mar. 2020.

OIE – OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. Avian influenza (infection with avian influenza viruses). In: **Manual of diagnostics tests and vaccines for terrestrial animals**. Paris: OIE, 2015. cap. 3.3.4, p. 821-843. Disponível em: < https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.03.04_AI.pdf>. Acesso em: 23 mar. 2020.

OIE – OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. Infectious with avian influenza viruses. In: **Manual of diagnostics tests and vaccines for terrestrial animals**. Paris: OIE, 2017a. cap. 10.4., p. 1-18. Disponível em: <https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahc/current/chapitre_avian_influenza_viruses.pdf>. Acesso em: 21 set. 2020.

OIE– OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. **Update on avian influenza in animals (types H5 and H7)**, 2017 b. Disponível em: < <https://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/update-on-avian-influenza/2017/>>. Acesso em: 15 mai. 2020.

OIE– OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. **Update on avian influenza in animals (types H5 and H7)**, 2018a. Disponível em: < <https://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/update-on-avian-influenza/2018/>>. Acesso em: 15 mai. 2020.

OIE– OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. OIE. Avian infectious laryngotracheitis In: Oie (Ed.). **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals**. Paris: OIE, 2018b. v.1, p.810-820.

OIE – OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. **Low pathogenic avian influenza (poultry), Chile. Follow-up Report 2 : 27/09/2019**, 2019a . Disponível em: < https://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Reviewreport/Review?page_refer=MapFullEventReport&reportid=31653 >. Acesso em: 13 nov. 2020.

OIE. Zoning and compartmentalisation. In: Oie (Ed.). **Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals: mammals, birds and bees**. Paris, France: Biological Standards Commission, World Organization for Animal Health, 2019b. p.1-6. Disponível em: <https://www.oie.int/fileadmin/home/eng/health_standards/tahc/current/chapitre_zoning_compartment.pdf>. Acesso em: 10 dez. 2020.

OIE – OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. **Highly pathogenic avian influenza (poultry), EUA. Follow-up report No.8 (Final report): 05/08/2020, 2020a**. Disponível em: <https://www.oie.int/wahis_2/temp/reports/en_fup_0000035302_20200806_144157.pdf>. Acesso em: 13 nov. 2020.

OIE – OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. **Disease outbreak maps - Newcastle disease, 2020b**. Disponível em: https://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/Diseaseoutbreakmaps?disease_type_hidden=0&disease_id_hidden=16&selected_disease_name_hidden=Newcastle+disease+%28+-+%29+&disease_type=0&disease_id_terrestrial=16&disease_id_aquatic=-999&selected_start_day=1&selected_start_month=1&selected_start_year=2005&selected_end_day=21&selected_end_month=4&selected_end_year=2020. Acesso em: 05 out. 2020.

OIE – OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. **Update on avian influenza in animals (types H5 and H7)**, 2020c. Disponível em: <<https://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/update-on-avian-influenza/2020/>>. Acesso em 10 nov. 2020.

OIE – OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. **Disease outbreak maps - Highly path. avian influenza, 2020d**. Disponível em: <https://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/Diseaseoutbreakmaps?disease_type_hidden=&disease_id_hidden=&selected_disease_name_hidden=&disease_type=0&disease_id_terrestrial=15&disease_id_aquatic=-999&selected_start_day=1&selected_start_month=1&selected_start_year=2005&selected_end_day=1&selected_end_month=12&selected_end_year=2020&submit2=OK>. Acesso em: 18 nov. 2020.

OIE – OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. Detailed country disease incidence - Infectious laryngotracheitis virus, 2020e. Disponível em: <https://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/statusdetail>. Acesso em 05 dez. 2020.

OIE. **Disease outbreak maps - Newcastle disease, 2020f**. Disponível em: <https://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/Diseaseoutbreakmaps?disease_type_hidden=0&disease_id_hidden=16&selected_disease_name_hidden=Newcastle+disease+%28+-+>

%29+&disease_type=0&disease_id_terrestrial=16&disease_id_aquatic=-999&submit1=OK&selected_start_day=1&selected_start_month=1&selected_start_year=2005&selected_end_day=1&selected_end_month=12&selected_end_year=2020 >. Acesso em: 01 dez. 2020.

OLDONI, I.; GARCÍA, M. Characterization of infectious laryngotracheitis virus isolates from the US by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism of multiple genome regions. **Avian Pathology**, v. 36, n. 2, p. 167-176, 2007.

OLDONI, I.; RODRÍGUEZ-ÁVILA, R.; RIBLET, S.; GARCÍA, M. Characterization of infectious laryngotracheitis virus (ILTV) isolates from commercial poultry by Polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). **Avian Diseases**, v. 52, n. 1, p. 59-63, 2008.

OLIVEIRA, E.; SILVA, K.; FERNANDO, F.; BORZI, M.; TAMANINI, M.; MONTASSIER, H. Desenvolvimento de ELISA competitivo com concanavalina A (C-CON A-ELISA) para o sorodiagnóstico da doença de newcastle em pombos de vida-livre. **Ars Veterinaria**, v. 29, n. 4, p. 12, 2013.

ORSI, M. A.; DORETTO, L.; CAMILLO, S. C. A.; REISCHAK, D.; RIBEIRO, S. A. M.; RAMAZZOTTI, A.; MENDONÇA, A. O.; SPILKI, F. R.; BUZINARO, M. G.; FERREIRA, H. L.; ARNS, C. W. A Survey for Maintenance of Virulent Newcastle Disease Virus-Free Area in Poultry Production in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 2, p. 368-375, 2010a.

ORSI, M. A.; DORETTO, L., JR.; CAMILLO, S. C.; REISCHAK, D.; RIBEIRO, S. A.; RAMAZZOTTI, A.; MENDONÇA, A. O.; SPILKI, F. R.; BUZINARO, M. G.; FERREIRA, H. L.; ARNS, C. W. Prevalence of newcastle disease virus in broiler chickens (*Gallus gallus*) in Brazil. **Braz J Microbiol**, v. 41, n. 2, p. 349-357, 2010b.

ORSI, M. A. **Caracterização Biológica, molecular, imunológica e estabilidade térmica das estirpes vacinais e de isolados da doença de Newcastle de aves de produção industrial e migratórias no Brasil**. Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP, Campinas, 2010. 146 p.

PALESE, P.; SHAW, M. L. Orthomyxoviridae: The viruses and their replication. In: Knipe, D. M., Howley, P. M., *et al* (Ed.). **Fields Virology**: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. v.v1, p.1647-1689.

PALOMINO-TAPIA, V. A.; ZAVALA, G.; CHENG, S.; GARCÍA, M. Long-term protection against a virulent field isolate of infectious laryngotracheitis virus induced

by inactivated, recombinant, and modified live virus vaccines in commercial layers. **Avian Pathology**, v. 48, n. 3, p. 209-220, 2019.

PAN, C.; JIANG, S. E14-F55 combination in M2 protein: a putative molecular determinant responsible for swine-origin influenza A virus transmission in humans. **PLoS Curr**, v. 1, n., p. RRN1044, 2009.

PAN, M.; GAO, R.; LV, Q.; HUANG, S.; ZHOU, Z.; YANG, L.; LI, X.; ZHAO, X.; ZOU, X.; TONG, W.; MAO, S.; ZOU, S.; BO, H.; ZHU, X.; LIU, L.; YUAN, H.; ZHANG, M.; WANG, D.; LI, Z.; ZHAO, W.; MA, M.; LI, Y.; LI, T.; YANG, H.; XU, J.; ZHOU, L.; ZHOU, X.; TANG, W.; SONG, Y.; CHEN, T.; BAI, T.; ZHOU, J.; WANG, D.; WU, G.; LI, D.; FENG, Z.; GAO, G. F.; WANG, Y.; HE, S.; SHU, Y. Human infection with a novel, highly pathogenic avian influenza A (H5N6) virus: Virological and clinical findings. **Journal of Infection**, v. 72, n. 1, p. 52-59, 2016.

PARRA, S. H.; NUNEZ, L. F.; ASTOLFI-FERREIRA, C. S.; FERREIRA, A. J. Persistence of the tissue culture origin vaccine for infectious laryngotracheitis virus in commercial chicken flocks in Brazil. **Poult Sci**, v. 94, n. 11, p. 2608-2615, 2015.

PAULILLO, A. C.; DORETTO JÚNIOR, L. Doença de Newcastle. In: Berchieri Junior, A., Silva, E. N. S., *et al* (Ed.). **Doenças das aves**. Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, 2009, p.587-608.

PAULO, S. Portaria CDA nº 4, de 20 de janeiro de 2004. v., n., p., 2004.

PHAM, H.; KONNAI, S.; USUI, T.; CHANG, K.; MURATA, S.; MASE, M.; OHASHI, K.; ONUMA, M. Rapid detection and differentiation of Newcastle disease virus by real-time PCR with melting-curve analysis. **Archives of virology**, v. 150, n. 12, p. 2429-2438, 2005.

PICCIRILLO, A.; LAVEZZO, E.; NIERO, G.; MORENO, A.; MASSI, P.; FRANCHIN, E.; TOPPO, S.; SALATA, C.; PALÙ, G. Full genome sequence-based comparative study of wild-type and vaccine strains of infectious laryngotracheitis virus from Italy. **PLOS ONE**, v. 11, n. 2, p. e0149529, 2016.

PILLAI, S.; GOPALAN, V.; LAM, A. K.-Y. Review of sequencing platforms and their applications in pheochromocytoma and paragangliomas. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 116, n., p. 58-67, 2017.

PORTZ, C.; BELTRÃO, N.; FURIAN, T. Q.; JÚNIOR, A. B.; MACAGNAN, M.; GRIEBELER, J.; ROSA, C. A. V. L.; COLODEL, E. M.; DRIEMEIER, D.; BACK, A. Natural infection of turkeys by infectious laryngotracheitis virus. **Veterinary microbiology**, v. 131, n. 1-2, p. 57-64, 2008.

PREIS, I. S.; BRAGA, J. F.; COUTO, R. M.; BRASIL, B. S.; MARTINS, N. R.; ECCO, R. Outbreak of infectious laryngotracheitis in large multi-age egg layer chicken flocks in Minas Gerais, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 5, p. 591-596, 2013.

PREIS, I. S.; FIZA, A. T. L.; SILVA, C. C.; BRAGA, J. F. V.; COUTO, R. M.; MARTINS, N. R. D.; ECCO, R. Pathological, Immunohistochemical, and Molecular Findings in Commercial Laying Hens and in Backyard Chickens Naturally Infected with the Infectious Laryngotracheitis Virus. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 16, n. 4, p. 359-365, 2014.

QI, W.; JIA, W.; LIU, D.; LI, J.; BI, Y.; XIE, S.; LI, B.; HU, T.; DU, Y.; XING, L. Emergence and adaptation of a novel highly pathogenic H7N9 influenza virus in birds and humans from a 2013 human-infecting low-pathogenic ancestor. **Journal of Virology**, v. 92, n. 2, p., 2018.

REISCHAK, D.; DOMINGUES, G. S.; BRONZATO, C. V. D. O.; ORSI, M. A.; PESSAMILIO, B. R.; RICHTZENHAIN, L. J. Active surveillance for avian influenza in spent laying hens and broiler breeders in Brazil: a four year survey. In: 9th International Symposium on Avian Influenza, 2015, Athens, p. 63.

REISCHAK, D. **Vírus da influenza aviária: monitoramento em aves de subsistência criadas no entorno de sítios de aves migratórias no Brasil**. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016. 137 p.

RODRÍGUEZ-AVILA, A.; OLDONI, I.; RIBLET, S.; GARCÍA, M. Replication and transmission of live attenuated infectious laryngotracheitis virus (ILTV) vaccines. **Avian Diseases**, v. 51, n. 4, p. 905-911, 2007.

ROUSSAN, D. A.; HADDAD, R.; KHAWALDEH, G. Molecular Survey of Avian Respiratory Pathogens in Commercial Broiler Chicken Flocks with Respiratory Diseases in Jordan. **Poultry Science**, v. 87, n. 3, p. 444-448, 2008.

ROY, P.; FAKHRUL ISLAM, A. F. M.; BURGESS, S. K.; HUNT, P. W.; MCNALLY, J.; WALKDEN-BROWN, S. W. Real-time PCR quantification of infectious laryngotracheitis virus in chicken tissues, faeces, isolator-dust and bedding material over 28 days following infection reveals high levels in faeces and dust. **Journal of general Virology**, v. 96, n. 11, p. 3338-3347, 2015.

SALANI, E. Sanidade, a nova barreira comercial do mercado mundial. v. n. p. 2006. Disponível em: <<http://www.beefpoint.com.br/cadeia-produtiva/espaco-aberto/sanidade-a-nova-barreira-comercial-do-mercado-mundial-28217>>. Acesso em: 05 jun. 2016.

SÃO PAULO (Estado). Secretaria de Agricultura e Abastecimento. **Resolução SAA nº 43**, de 17 de novembro de 2005. Disponível em: <<https://www.defesa.agricultura.sp.gov.br/legislacoes/resolucao-saa-43-de-17-11-2005,717.html>>. Acesso em: 09 nov. 2020.

SÃO PAULO (Estado). Coordenadoria de Defesa Agropecuária. **Portaria CDA nº 6**, de 11 de fevereiro de 2011. Disponível em: <<https://www.defesa.agricultura.sp.gov.br/legislacoes/portaria-cda-6-de-11-02-2011,906.html>>. Acesso em: 09 nov. 2020.

SÃO PAULO (Estado). Coordenadoria de Defesa Agropecuária, **Portaria CDA nº 02**, de 07 de fevereiro de 2012.

SÃO PAULO (Estado). Coordenadoria de Defesa Agropecuária. **Portaria CDA nº 40**, de 05 de julho de 2013. Disponível em: <<https://www.defesa.agricultura.sp.gov.br/legislacoes/portaria-cda-40-de-05-07-2013,973.html>>. Acesso em: 09 nov. 2020

SÃO PAULO (Estado). **Plano Paulista de Prevenção da Influenza Aviária**, 2015. Disponível: <<https://www.defesa.agricultura.sp.gov.br/influenza-aviaria/plano-de-trabalho/>>. Acesso em: 10 dez. 2020.

SÃO PAULO (Estado). Com 5 bilhões de ovos por ano, Bastos é maior produtora de SP. **SPNotícias**, 2019a. São Paulo, 22 jul. 2019. Disponível em: <<https://www.saopaulo.sp.gov.br/spnoticias/com-5-bilhoes-de-ovos-por-ano-bastose-maior-produtor-do-estado/>>. Acesso em 10 dez. 2020.

SÃO PAULO (Estado). Resolução SAA Nº 6, de 26 de fevereiro de 2019. **Dispõe sobre considerar de peculiar interesse do Estado, a Laringotraqueíte Infecciosa das Aves (LTI), estabelece procedimentos para sua prevenção e controle no âmbito do Estado de São Paulo, e dá providências correlatas.** 2019b.

SCHERER, A.; SCHERER, J.; PETRY, M.; SANDER, M. Occurrence and interaction of wild birds at poultry houses in Southern Brazil. **Ararajuba**, v. 1, n., p. 74-79, 2011.

SCHMITZ, A.; RIESNER, D. Purification of nucleic acids by selective precipitation with polyethylene glycol 6000. **Analytical Biochemistry**, v. 354, n. 2, p. 311-313, 2006.

SCHRAUWEN, E. J.; DE GRAAF, M.; HERFST, S.; RIMMELZWAAN, G. F.; OSTERHAUS, A. D.; FOUCHIER, R. A. Determinants of virulence of influenza A virus. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases**, v. 33, n. 4, p. 479-490, 2014.

SDA-MAPA - SECRETARIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Instrução Normativa no 50, de 24 de Setembro de 2013**. Brasília, DF, 2013.

SDA-MAPA - SECRETARIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Certificação Sanitária da Compartimentação da Cadeia Produtiva Avícola das granjas de reprodução, de corte e incubatórios, de galinhas ou perus, para a infecção pelos vírus de influenza aviária - IA e doença de Newcastle - DNC**. Brasília, DF, 2014.

SELLERS, H. S.; GARCIA, M.; GLISSON, J. R.; BROWN, T. P.; SANDER, J. S.; GUY, J. S. Mild infectious laryngotracheitis in broilers in the southeast. **Avian Dis**, v. 48, n. 2, p. 430-436, 2004.

SHANKAR, B. Common respiratory diseases of poultry. **Veterinary World**, v. 1, n. 7, p. 217, 2008.

SHEHATA, A. A.; HALAMI, M. Y.; SULTAN, H. H.; ABD EL-RAZIK, A. G.; VAHLENKAMP, T. W. Chicken embryo origin-like strains are responsible for Infectious laryngotracheitis virus outbreaks in Egyptian cross-bred broiler chickens. **Virus Genes**, v. 46, n. 3, p. 423-430, 2013.

SHINYA, K.; HAMM, S.; HATTA, M.; ITO, H.; ITO, T.; KAWAOKA, Y. PB2 amino acid at position 627 affects replicative efficiency, but not cell tropism, of Hong Kong H5N1 influenza A viruses in mice. **Virology**, v. 320, n. 2, p. 258-266, 2004.

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

SOUZA, S. O.; FREDO, G.; DUPONT, P. M.; LEITE-FILHO, R. V.; TEIFKE, J. P.; PAVARINI, S. P.; CANAL, C. W.; DRIEMEIER, D. Pathological and molecular findings of avian avulavirus type 1 outbreak in pigeons (*Columba livia*) of southern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 12, p. 2254-2261, 2018.

SPACKMAN, E.; SENNE, D. A.; MYERS, T. J.; BULAGA, L. L.; GARBER, L. P.; PERDUE, M. L.; LOHMAN, K.; DAUM, L. T.; SUAREZ, D. L. Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 9, p. 3256-3260, 2002.

SPACKMAN, E.; SENNE, D. A.; BULAGA, L. L.; TROCK, S.; SUAREZ, D. L. Development of multiplex real-time RT-PCR as a diagnostic tool for avian influenza. **Avian Dis**, v. 47, n. 3 Suppl, p. 1087-1090, 2003.

SPACKMAN, E. Avian Influenza Virus Detection and Quantitation by Real-Time RT-PCR. In: (Ed.). **Animal Influenza Virus**: Springer, 2020, p.137-148.

SPATZ, S. J.; VOLKENING, J. D.; KEELER, C. L.; KUTISH, G. F.; RIBLET, S. M.; BOETTGER, C. M.; CLARK, K. F.; ZSAK, L.; AFONSO, C. L.; MUNDT, E. S.; ROCK, D. L.; GARCIA, M. Comparative full genome analysis of four infectious laryngotracheitis virus (*Gallid herpesvirus-1*) virulent isolates from the United States. **Virus Genes**, v. 44, n. 2, p. 273-285, 2012.

SPATZ, S. J.; RIBLET, S. M.; ROSS, T. A.; GARCIA, M. Infectious laryngotracheitis genomics: What's circulating in the backyard flocks from the United States? In: 66th Western Poultry Disease Conference, 2017, Sacramento, Califórnia, March 20-22, p. 177-182.

SPATZ, S. J.; GARCIA, M.; RIBLET, S.; ROSS, T. A.; VOLKENING, J. D.; TAYLOR, T. L.; KIM, T.; AFONSO, C. L. MinION sequencing to genotype US strains of infectious laryngotracheitis virus. **Avian Pathology**, v. 48, n. 3, p. 255-269, 2019.

SPICKLER, A. R.; TRAMPEL, D. W.; ROTH, J. A. The onset of virus shedding and clinical signs in chickens infected with high-pathogenicity and low-pathogenicity avian influenza viruses. **Avian Pathology**, v. 37, n. 6, p. 555-577, 2008.

STALLKNECHT, D. Impediments to wildlife disease surveillance, research, and diagnostics. In: (Ed.). **Wildlife and emerging zoonotic diseases: the biology, circumstances and consequences of cross-species transmission**: Springer, 2007, p.445-461.

SUAREZ, D. L.; DAS, A.; ELLIS, E. Review of rapid molecular diagnostic tools for avian influenza virus. **Avian Dis**, v. 51, n. 1 Suppl, p. 201-208, 2007.

SUN, Z.; QIN, T.; MENG, F.; CHEN, S.; PENG, D.; LIU, X. Development of a multiplex probe combination-based one-step real-time reverse transcription-PCR for NA subtype typing of avian influenza virus. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-11, 2017.

SWAYNE, D.; PANTIN-JACKWOOD, M. Pathobiology of avian influenza virus infections in birds and mammals. In: Swayne, D. (Ed.). **Avian influenza**. Ames, IA: Blackwell Publishing, 2008, p.87-122.

SWAYNE, D. **Avian Influenza**. Ames, IA: Blackwell Publishing, 2008. 611 p. (Avian influenza)

SWAYNE, D.; SUAREZ, D. L.; SLIMS, L. D. Influenza. In: Swayne, D. (Ed.). **Diseases of Poultry**. Ames, IA.: John Wiley & Sons, Inc., 2013, p.181-218.

SWAYNE, D. E.; HALVORSON, D. A. Influenza. In: Saif, Y. M. (Ed.). **Diseases of Poultry**. Ames: Iowa State Press, 2003, p.135-160.

SWAYNE, D. E.; PANTIN-JACKWOOD, M. **Developments in Biologicals**, v. 124, p. 61, 2006.

SWAYNE, D. E. Understanding the complex pathobiology of high pathogenicity avian influenza viruses in birds. **Avian Diseases**, v. 51, n., p. 242-249, 2007.

SWAYNE, D. E. High pathogenicity avian influenza in the Americas. In: Swayne, D. E. (Ed.). **Avian influenza**. Ames, IA: Blackwell, 2008, p.191-216.

SWAYNE, D. E.; HALVORSON, D. A. Influenza. In: Y.M., S., Fadly, A. M., *et al* (Ed.). **Diseases of Poultry**. Ames, IA: Blackwell Publishing 2008.

SWAYNE, D. E.; SPACKMAN, E. Current status and future needs in diagnostics and vaccines for high pathogenicity avian influenza. **Dev Biol (Basel)**, v. 135, n., p. 79-94, 2013.

SWAYNE, D. E.; HILL, R. E.; CLIFFORD, J. Safe application of regionalization for trade in poultry and poultry products during highly pathogenic avian influenza outbreaks in the USA. **Avian Pathology**, v. 46, n. 2, p. 125-130, 2017.

SWAYNE, D. E.; SUAREZ, D. L.; SIMS, L. D. Influenza. In: Boulianne, D. E. S. M., Logue, C. M., *et al* (Ed.). **Diseases of poultry**. Ames, IA: Wiley Blackwell, 2020. v.2, p.210-256.

TAMURA, K.; NEI, M.; KUMAR, S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 30, p. 11030-11035, 2004.

TERREGINO, C.; TOFFAN, A.; CILLONI, F.; MONNE, I.; BERTOLI, E.; CASTELLANOS, L.; AMARIN, N.; MANCIN, M.; CAPUA, I. Evaluation of the protection induced by avian influenza vaccines containing a 1994 Mexican H5N2 LPAI seed strain against a 2008 Egyptian H5N1 HPAI virus belonging to clade 2.2. 1 by means of serological and in vivo tests. **Avian Pathology**, v. 39, n. 3, p. 215-222, 2010.

THOMAZELLI, L. M.; ARAUJO, J. D.; FERREIRA, C. D. S.; HURTADO, R.; OLIVEIRA, D. B.; OMETTO, T.; GOLONO, M.; SANFILIPPO, L.; DEMETRIO, C.; FIGUEIREDO, M. L.; DURIGON, E. L. Molecular Surveillance of the Newcastle Disease Virus in Domestic and Wild Birds on the North Eastern Coast and Amazon Biome of Brazil. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 14, n. 1, p. 1-7, 2012.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Res**, v. 22, n. 22, p. 4673-4680, 1994.

TRIPATHY, D. N. 21 INFECTIOUS LARYNGOTRACHF. il IS Deoki N. Tripathy and Man carmen Garcia. **A laboratory manual for the isolation, identification, and characterization of avian pathogens**, v., n., p. 94, 2008.

USDA - UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. 2014-2015 HPAI OUTBREAK. 2015. Disponível em: <<https://www.aphis.usda.gov/aphis/ourfocus/animalhealth/animal-disease-information/avian/2014-2015-hpai-outbreak>>. Acesso em 03 dez. 2020.

VAN BORM, S.; BELAK, S.; FREIMANIS, G.; FUSARO, A.; GRANBERG, F.; HOPER, D.; KING, D. P.; MONNE, I.; ORTON, R.; ROSSEEL, T. Next-generation sequencing in veterinary medicine: how can the massive amount of information

arising from high-throughput technologies improve diagnosis, control, and management of infectious diseases? **Methods Mol Biol**, v. 1247, n., p. 415-436, 2015.

VAN BORM, S.; RIZOTTO, L. S.; ULLMANN, L. S.; SCAGION, G. P.; MALOSSI, C. D.; SIMAO, R. M.; ARAUJO, J. P., JR.; CORDEIRO, I. M.; KEID, L. B.; OLIVEIRA, T. M.; SOARES, R. M.; MARTINI, M. C.; ORSI, M. A.; ARNS, C. W.; FERREIRA, H. L. Complete Genome Sequence of a Vaccinal Newcastle Disease Virus Strain Isolated from an Owl (*Rhinoptynx clamator*). **Genome Announc**, v. 4, n. 6, p., 2016.

VARGAS, R. E. S. **Laringotraqueíte infecciosa das aves; Estudo epidemiológico em plantéis avícolas do Estado do Rio Grande do Sul.** (Tese de Mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1995. 106 p.

VAZ, F. F.; SERAFINI, P. P.; LOCATELLI-DITTRICH, R.; MEURER, R.; DURIGON, E. L.; ARAÚJO, J. D.; THOMAZELLI, L. M.; OMETTO, T.; SIPINSKI, E. A. B.; SEZERBAN, R. M. Survey of pathogens in threatened wild red-tailed Amazon parrot (*Amazona brasiliensis*) nestlings in Rasa Island, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 4, p. 747-753, 2017.

VILLANUEVA, J. L. C. **Epidemiologia molecular do vírus da laringotraqueíte infecciosa isolados de surtos em poedeiras comerciais no Estado de São Paulo.** Universidade de São Paulo, 2009.

VILLARREAL, L.; BRANDÃO, P.; CHACÓN, J.; DORETTO JUNIOR, L.; ITO, N.; GAMA, N.; ISHIZUKA, M.; LUCHESE, A.; BUCHALA, F.; ASTOLFI-FERREIRA, C. Detection and molecular characterization of infectious laryngotracheitis virus in laying hens in Brazil. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 6, n. 4, p. 253-256, 2004.

WIBOWO, M. H.; UNTARI, T.; ARTANTO, S.; PUTRI, K.; AMANU, S.; ASMARA, W. Evaluation of rapid detection kit against avian influenza A virus and H5 subtype for field Sample. **Indonesian Journal of Biotechnology**, v. 21, n. 1, p. 48-55, 2016.

WILLIAMS, R. A.; ALAFALEQ, 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, 1992.

WISE, M. G.; SUAREZ, D. L.; SEAL, B. S.; PEDERSEN, J. C.; SENNE, D. A.; KING, D. J.; KAPCZYNSKI, D. R.; SPACKMAN, E. Development of a real-time reverse-transcription PCR for detection of newcastle disease virus RNA in clinical samples. **J Clin Microbiol**, v. 42, n. 1, p. 329-338, 2004.

WOODFORD, M. H. Veterinary aspects of ecological monitoring: the natural history of emerging infectious diseases of humans, domestic animals and wildlife. **Trop Anim Health Prod**, v. 41, n. 7, p. 1023-1033, 2009.

WTO, W. T. O. Committee on sanitary and Phytosanitary Measures. **G/SPS/Gen/608**, v. 08 December, n., p., 2005.

YAVUZ, O.; ÖZDEMİR, Ö.; ZEKI, A.; TERZI, F. Immunohistochemical Studies on Infectious Laryngotracheitis in the Respiratory Tract Lesions in Naturally Infected Laying Hens. **Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi**, v. 24, n. 2, p., 2018.

YEO, S.-J.; BAO, D. T.; SEO, G.-E.; BUI, C. T.; ANH, N. T. V.; TIEN, T. T. T.; LINH, N. T. P.; SOHN, H.-J.; CHONG, C.-K.; SHIN, H.-J. Improvement of a rapid diagnostic application of monoclonal antibodies against avian influenza H7 subtype virus using Europium nanoparticles. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-11, 2017.

YI, J.; LIU, C. Detecting Newcastle disease virus in combination of RT-PCR with red blood cell absorption. **Virology journal**, v. 8, n. 1, p. 202, 2011.

YORK, J. J.; FAHEY, K. J.; BAGUST, T. J. Development and Evaluation of an Elisa for the Detection of Antibody to Infectious Laryngotracheitis Virus in Chickens. **Avian Diseases**, v. 27, n. 2, p. 409-421, 1983.

YORK, J. J.; SONZA, S.; BRANDON, M. R.; FAHEY, K. J. Antigens of infectious laryngotracheitis herpesvirus defined by monoclonal antibodies. **Archives of virology**, v. 115, n. 3, p. 147-162, 1990.

YOUK, S.; LEE, D.-H.; FERREIRA, H. L.; AFONSO, C. L.; ABSALON, A. E.; SWAYNE, D. E.; SUAREZ, D. L.; PANTIN-JACKWOOD, M. J. Rapid evolution of Mexican H7N3 highly pathogenic avian influenza viruses in poultry. **PLOS ONE**, v. 14, n. 9, p. e0222457, 2019.

YU, J.; XIE, J.; CAO, Y.; KANG, R.; LIN, Y.; WEI, Y.; LIAO, D.; LI, X.; YE, Y.; PAN, M. A modified loop-mediated isothermal amplification method for detecting avian infectious laryngotracheitis virus. **Animal Biotechnology**, v., n., p. 1-8, 2020.

ZANETTI, F.; MATTIELLO, R.; GARBINO, C.; KALOGHLIAN, A.; TERRERA, M. V.; BOVIEZ, J.; PALMA, E.; CARRILLO, E.; BERINSTEIN, A. Biological and molecular characterization of a pigeon paramyxovirus type-1 isolate found in Argentina. **Avian Diseases**, v. 45, n. 3, p. 567-571, 2001.

ZAVALA, G. The old and new landscapes of infectious laryngotracheitis. **Poult Inf Prof**, v., n., p. 1-7, 2011.

ZHAO, Y.; KONG, C. C.; CUI, X. L.; CUI, H. Y.; SHI, X. M.; ZHANG, X. M.; HU, S. L.; HAO, L. W.; WANG, Y. F. Detection of Infectious Laryngotracheitis Virus by Real-Time PCR in Naturally and Experimentally Infected Chickens. **PLoS One**, v. 8, n. 6, p., 2013.

ZIEGLER, A. F.; DAVISON, S.; ACLAND, H.; ECKROADE, R. J. Characteristics of H7N2 (Nonpathogenic) Avian Influenza Virus Infections in Commercial Layers, in Pennsylvania, 1997-98. **Avian Diseases**, v. 43, p. 142-149, 1999.