

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  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  o primeiro relato da obtenção do genoma completo de VLTI no Brasil e sua caracterização genmica desde o início da circulação do vírus na região há pelo menos dez anos. O monitoramento contínuo da área  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. Laringotraquete 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.