

**UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
DOUTORADO EM HIGIENE VETERINÁRIA E PROCESSAMENTO TECNOLÓGICO DE
PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL**

FERNANDA MARTINEZ XAVIER ALVES

**ESTUDO DE CASO-CONTROLE POR
ANATOMOPATOLOGIA E RT-PCR DA
DOENÇA INFECCIOSA DA BOLSA DE
FABRÍCIO (DIB) ASSOCIADA A CASO
DE CELULITE EM FRANGOS DE
CORTE SOB INSPEÇÃO SANITÁRIA
FEDERAL**

**NITERÓI – RJ
2009**



FERNANDA MARTINEZ XAVIER ALVES

ESTUDO DE CASO-CONTROLE POR ANATOMOPATOLOGIA E RT-PCR DA DOENÇA INFECCIOSA DA BOLSA DE FABRÍCIO (DIB) ASSOCIADA A CASO DE CELULITE EM FRANGOS DE CORTE SOB INSPEÇÃO SANITÁRIA FEDERAL

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor
Área de Concentração: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem

Animal.

Orientador: PROF. DR ROGERIO TORTELLY

Co-orientador: PROF. DRA. VIRGINIA LÉO DE ALMEIDA PEREIRA

Niterói/RJ

2009

FERNANDA MARTINEZ XAVIER ALVES

ESTUDO DE CASO-CONTROLE POR ANATOMOPATOLOGIA E RT-PCR DA DOENÇA INFECCIOSA DA BOLSA DE FABRÍCIO (DIB) ASSOCIADA A CASO DE CELULITE EM FRANGOS DE CORTE SOB INSPEÇÃO SANITÁRIA FEDERAL

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor Área de Concentração: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal.

Aprovado em 18 de fevereiro de 2009

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rogerio Tortelly
Universidade Federal Fluminense

Prof^a. Dra. Virginia Léo de Almeida Pereira
Universidade Federal Fluminense

Prof. Dr. Elmiro Rosendo do Nascimento
Universidade Federal Fluminense

Prof. Dr. Eulógio Carlos Queiroz de Carvalho
Universidade Estadual do Norte Fluminense

Prof. Dr. Fernando Augusto Curvello
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

**Niterói/RJ
2009**

À minha mãe por todo amor, apoio e educação ao longo da minha vida, por estar ao meu lado incondicionalmente em todos os momentos.

À minha família que mesmo de longe sempre me apoio.

Ao meu noivo Vinicius de Queiroz Teixeira, por todo seu amor, companheirismo, dedicação.

AGRADECIMENTOS

Ao prof. Dr. Rogerio Tortelly pela amizade, voto de confiança, orientação e apoio ao longo da minha jornada acadêmica finalizando com a produção desta tese.

À prof. Dra Virginia Léo de Almeida Pereira pela amizade, orientação, incentivo e dedicação em todos os momentos. Muito obrigada.

Ao Prof. Dr. Elmiro Rosendo do Nascimento pelo seu incentivo nos momentos difíceis, paciência e dedicação.

Ao Dr. Antonio Marco Pastore Guimarães pelo fornecimento das amostras, ajuda e empenho na coleta das mesmas.

Ao Dr. Alex William Hofmeister e aos agentes de inspeção pela colaboração na obtenção das amostras.

Ao Prof. Dr. Nelson Rodrigo da Silva Martins e Prof. Dr. Mauricio Resende por ter me recebido em seus laboratórios da UFMG, e ter proporcionado auxílio para realização da tese.

A Dra. Adriana Gomes pelo seu apoio e por repartir seus conhecimentos

As doutorandas Priscila, Sandra e Renata pelo incentivo

Ao amigo Drausio Ferreira de Paiva, secretário da coordenação de Pós- Graduação pela amizade, ajuda e paciência ao longo dessa jornada.

À prof. Dayse pela amizade e ajuda.

As amigas Patricia Riddell, Joana Fernandes, Kênia Carrijo por sempre estarem presentes em todos os momentos.

Aos amigos do laboratório Leandro Machado, Raquel Gouvêa, Sandra Batista, Juliana Almeida, Felipe Faccini, Liana Lumi, Ariane, Rita de Cássia da Silva.

À Prof. Dra. Mônica Queiroz de Freitas coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal, por todo o apoio nas solicitações.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pelo auxílio financeiro concedido.

SUMÁRIO

RESUMO, p. 11

ABSTRACT, p. 12

1 INTRODUÇÃO, p. 14

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA, p. 17

2.1 PRODUÇÃO E COMERCIALIZAÇÃO DA CARNE DE FRANGO, p. 17

2.2 DOENÇA INFECCIOSA DA BOLSA DE FABRÍCIO (DIB), p. 18

2.2.1 Histórico, p. 18

2.2.2 O Vírus , p.19

2.2.3 Patogenia, p. 21

2.2.4 Sinais clínicos, p. 22

2.2.5 Diagnóstico, p. 23

2.2.5.1 Anatomia patológica, p. 23

2.2.5.2 Sorologia, p.26

2.2.5.3 RT- PCR, p. 27

2.2.6 Prevenção e Controle, p. 28

2.3 ANEMIA INFECCIOSA DAS GALINHAS, p. 30

2.4 CELULITE, p. 31

2.4.1 Tecidoepitelial,p.31

2.4.2 Lesões cutâneas, p. 32

2.4.3 Celulite, p. 33

2.4.4 Prejuízos econômicos, p. 34

2.4.5 Manejo das aves, p. 35

2.4.6 Diagnóstico anatomopatológico, p. 36

3 MATERIAL E MÉTODO, p. 39

3.1 ORIGEM DO MATERIAL, p. 39

3.2 AS AMOSTRAS, p. 39

3.3 MENSURAÇÃO DA BOLSA DE FABRÍCIO, p. 40

3.4 PROCESSAMENTO DOS TECIDOS PARA HISTOPATOLOGIA, p. 40

3.5 RT-PCR e PCR , p. 41

3.5.1 Controle positivo, p. 41

3.5.2 Extração do RNA, p. 41

3.5.2.1 Método Trizol, p. 41

3.5.3 Primers, p. 42

3.5.4 RT-PCR, p. 43

3.5.5 Eletroforese em gel de Agarose, p. 44

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA, p. 44

4 RESULTADOS, p. 45

4.1 CELULITE, p. 45

4.1.1 Exame macroscópico, p. 45

4.1.2 Exame histopatológico, p. 46

4.2 BAÇO, p. 48

4.2.1 Exame Histopatológico, p. 48

4.2.2 PCR, p. 49

4.3 BOLSA DE FABRÍCIO, p. 49

4.3.1 Exame macroscópico e Mensuração da bolsa de Fabrício, p. 49

4.3.2 Exame histopatológico, p. 50

4.3.3 RT-PCR, p. 57

5 DISCUSSÃO, p. 64

6 CONCLUSÃO, p. 68

7 OBRAS CITADAS, p. 69

8 ANEXOS, p. 75

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Estrutura e Organização do Genoma do VDIB, p. 20

Figura 2. Frango. Celulite. Pele espessada de coloração amarelada (seta), p. 45

Figura 3. Frango. Celulite. Inúmeras placas fibrinosas (setas), p. 46

Figura 4. Frango. Celulite. Placa de característica fibrinosa rica em restos celulares (seta), envolta por macrófagos e células gigantes multinucleadas (cabeça de seta). H.E. obj. 20X, p. 47

Figura 5. Frango. Celulite. Edema e restos celulares no tecido subcutâneo. H.E. obj. 10X, p. 47

Figura 6. Frango. Celulite. Múltiplos nódulos (seta) de constituição mononuclear na musculatura regional, p. 48

Figura 7. Frango. Baço. Depleção linfóide e hiperplasia de células reticulares H.E. obj. 10X., p. 49

Figura 8 – Bursômetro com bolsas de tamanhos 3 e 4, p. 50

Figura 9. Frango. Bolsa de Fabrício. Arquitetura normal do órgão. H.E 10X (Escore 0), p. 51

Figura 10. Frango. Bolsa de Fabrício. Necrose dos elementos linfóides de múltiplos folículos (seta) (Escore 2). H.E 10X, p. 51

Figura 11. Frango. Bolsa de Fabrício. Infiltrado de heterófilo no interstício (seta) espessado por fibrose (cabeça de seta). Perda da arquitetura do órgão. (Escore 3). H.E. obj. 20X, p. 52

Figura 12. Frango. Bolsa de Fabrício. Presença de múltiplos cistos, de variados diâmetros, intrafoliculares (seta) (Escore 3). H.E. obj. 10X, p. 52

Figura 13. Frango. Bolsa de Fabrício. Aspecto cirrótico do órgão. Nota-se acentuada fibrose (seta), atrofia de folículos (cabeça de seta) e múltiplos cistos foliculares (C) (Escore 3). H.E. obj. 4X, p. 53

Figura 14. Frango. Bolsa de Fabrício. Aspecto cirrótico do órgão. Nota-se acentuada fibrose (seta), atrofia de folículos (cabeça de seta) e múltiplos cistos foliculares (C) (Escore 3). H.E. obj. 10X, p. 53

Figura 15. RT-PCR para detecção do vírus da Doença Infecciosa da Bolsa de Fabrício em frangos de corte portadores de celulite - **GRUPO CASO**. *Primers* utilizados **LVC 108 e 109**. **M.** LADDER, 100pb; **C+**. Vacina GUMBOR-VET, cepa intermediária; **C+a.** Vacina GUMBOR-VET, cepa forte **Amostras positivas: 1, 2, 3, 5, 6, 7, 9, 11, 15.** **Amostras negativas: 4, 8, 10, 12, 13, 14 e C-** (água), p. 57

Figura 16. RT-PCR para detecção do vírus da DIB em bolsas de Fabrício de frangos de corte portadores de celulite - **GRUPO CASO**. *Primers* utilizados **LVC 128 e 129**. **M.** LADDER, 100pb; **C+**. Vacina GUMBOR-VE cepa intermediária; **C+** Vacina GUMBOR-VE cepa forte; **Amostras positivas: 4, 5, 8, 10.** **Amostras negativas: 1, 2, 3, 6, C-** (água), p. 58

Figura 17. RT-PCR para detecção do vírus da DIB em bolsas de Fabrício de frangos de corte portadores de celulite - **GRUPO CASO**. *Primers* utilizados **LVC 128 e 129**. **M.** LADDER, 100pb; **C+**. Vacina GUMBOR-VET, cepa intermediária; **Amostras positivas: 1, 4.** **Amostras negativas: 2, 3, C-** (água), p. 58

Figura 18. RT-PCR para detecção do vírus da DIB em bolsas de Fabrício de frangos de corte portadores de celulite - **GRUPO CASO**. *Primers* utilizados **LVC 128 e 129**. **M.** LADDER, 100pb; **C+**. Vacina GUMBOR-VET cepa intermediária; **C+a.** Vacina GUMBOR-VET cepa forte. **Amostras positivas: 4, 5, 6, 7.** **Amostras negativas: 1, 2, 3, 8, 9, 10, 11, 12, C-** (água), p. 59

Figura 19. RT-PCR para detecção do vírus da DIB em bolsas de Fabrício de frangos de corte sem celulite - **GRUPO CONTROLE**. *Primers* utilizados **LVC 128 e 129**. **M.** LADDER, 100pb; **C+**. Vacina GUMBOR-VET cepa intermediária; **5** Bolsa 4; **M.** LADDER, 100pb; **C+a.** Vacina GUMBOR-VET cepa forte; **Amostras positivas: 5, 7, 8.** **Amostras negativas: 1, 2, 3, 4, 6, C-** (água), p. 59

Figura 20. RT-PCR para detecção do vírus da DIB em bolsas de Fabrício de frangos de corte sem celulite - **GRUPO CONTROLE**. *Primers* utilizados **LVC 128 e 129**. **M.** LADDER, 100pb; **C+**. Vacina GUMBOR-VET, cepa intermediária; **C+a.** Vacina GUMBOR-VET cepa forte; **Amostras positivas: 1, 2, 3, 4.** **Amostras negativas: 6, 7, 8, 9, 10 e C-** (água), p. 60

LISTA DE QUADROS E TABELAS

QUADRO 1. Descrição dos *primers* utilizados na RT-PCR para detecção do vírus da Doença Infecciosa da Bolsa de Fabrício, p. 42

QUADRO 2. Programas de RT-PCR para Detecção do Vírus da Doença infecciosa da Bolsa de Fabrício de acordo com o par de *primers* utilizados, p. 43

QUADRO 3. Análise histopatológica do grupo caso, p.54

QUADRO 4. Análise histopatológica do grupo controle, p. 55

Tabela 1. Escore de lesões na bolsa de Fabrício em frangos de corte portadores de celulite (caso) e sem a enfermidade (controle), p. 57

Tabela 2. RT-PCR para VDIB e lesões histológicas na Bolsa de Fabrício em frangos de corte sob Inspeção Sanitária, p. 62

Tabela 3. RT-PCR para VDIB em frangos de corte portadores de celulite e sem a enfermidade, p. 63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABEF	Associação Brasileira dos Exportadores de Frango
AcM	Anticorpos maternos
AGP	Agar - gel precipitação
CIAV	Vírus da Anemia Infecciosa das Galinhas
DIB	Doença Infecciosa da Bolsa de Fabrício
ELISA	“Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”
EUA	Estados Unidos da América
FAO	“Food and Agriculture Organization”
HACCP	“Hazard Analysis and Critical Control Point”
H.E	Hematoxilina-eosina
IgM	Imunoglobulina M
obj	Objetiva
OCDE	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico
PCR	“Polymerase Chain Reaction”
RT/PCR	“Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction”
RFLP	Corte com enzima de restrição
SPF	Aves livres de patógenos
SN	Soroneutralização
UBA	União Brasileira de Avicultura
vvVDIBs	Cepas Muito Virulentas do Vírus da Doença Infecciosa da Bolsa de Fabrício
VDIB	Vírus da Doença Infecciosa da Bolsa de Fabrício

RESUMO

A avicultura industrial no Brasil evoluiu muito em tecnologia nos últimos anos, entretanto algumas doenças imunodepressoras, como a doença infecciosa da bolsa de Fabrício (DIB), ainda preocupam os sanitaristas. A DIB é uma doença viral aguda, altamente contagiosa, que afeta aves jovens, comprometendo o tecido linfóide, principalmente a bolsa de Fabrício que por causar imunodepressão nas aves, favorece o aparecimento de outras enfermidades como problemas respiratórios, caquexia, dermatites e celulites que provocam inúmeros prejuízos econômicos na indústria avícola. Este trabalho foi realizado com o objetivo de identificar a doença Infecciosa da bolsa de Fabrício pela anatomopatologia e RT-PCR e sua relação com a celulite em frangos de corte sob Inspeção Sanitária Federal. Foi realizado um estudo epidemiológico de caso – controle, onde o grupo caso foi constituído por 68 aves portadoras de celulite e o grupo controle, por 60 aves sem a doença. Os 128 frangos de corte apresentavam idade entre 40 e 48 dias, foram vacinados contra a DIB no 14º dia de vida (via água de bebida) e abatidos sob inspeção sanitária. Após o exame macroscópico foram coletados fragmentos de pele (lesada e íntegra) em formol a 10%, bolsa de Fabrício e o baço. As bolsas ao serem coletadas, foram medidas em bursômetro e registradas de acordo com sua escala. A bolsa e o baço foram repartidos, metade acondicionada em formol a 10%, para histopatologia e metade acondicionada em gelo para posterior processamento biomolecular. A histopatologia foi realizada pelo processamento por técnicas habituais para a inclusão em parafina até a coloração em H.E, no serviço de Anatomia Patológica da Universidade Federal Fluminense (UFF). Foi criado um escore para análise histológica das lesões das bolsas com os seguintes critérios: escore 0 – sem lesão; escore 1 – discretas hiperplasia e rarefação linfóide de folículos; 2 – edema, infiltrado inflamatório, necrose de folículos, rarefação linfóide severa e atrofia discreta de folículos; escore 3 – presença de cistos foliculares e epiteliais, atrofia severa de folículos e fibrose. Os fragmentos de bolsa refrigerados foram levados para o laboratório de Epidemiologia Molecular da UFF para realização da RT-PCR. Os fragmentos de baço foram encaminhados para PCR no laboratório de Doença da Aves da Universidade Federal de Minas Gerais. Microscopicamente todas as lesões de pele do grupo caso foram confirmadas como celulite. Lesões amareladas em placas no subcutâneo de frangos de corte devem ser consideradas como celulite. Em relação à microscopia da bolsa de Fabrício foram encontrados uma bolsa com escore 0; três, com escore 1; 25, com escore 2; e 99, com escore 3. Na realização da RT-PCR para o vírus da DIB, o grupo caso apresentou 22 amostras positivas e o grupo controle nove amostras positivas. Houve diferença estatística ($p < 0,05$) pelo Qui-quadrado Kruskal-Wallis entre os grupos caso e controle em relação à gravidade das lesões de bolsa de Fabrício obtidas. Pela análise de Risco, a presença do vírus da DIB favoreceu em 2,17 vezes o aparecimento de celulite. A presença do vírus da DIB detectado pela RT-PCR, favoreceu a presença de celulite (Qui-quadrado Exato de Fischer, $p < 0,05$).

Palavras-chave: frango de corte, bolsa de Fabrício, celulite, histopatologia, RT-PCR.

ABSTRACT

The aviculture was to the farming activity that more developed in Brazil in the last years. It reaching a high level of development, but in spite of all the technological and sanitary advancements some immunodepressing diseases still worries the health workers, like the infectious disease of the bursa of Fabricius (DIB). The DIB is a disease viral acute, highly contagious, what affects young birds, compromising the tissue lymphoid, principally the bursa of Fabrícius, causing immunodepressing in the birds and favoring the appearance of other illnesses like respiratory problems, cachexy, dermatitis and cellulitis, being the cellulitis responsible for countless economical damages in the industry poultry raiser. In the present work a study epidemiologic type case – control was carried out, where 128 broiler chickens were valued, between 40 and 48 days of age, under sanitary inspection, vaccinated against the DIB in the 14th day of life (he was seeing water of drink). The group if it was appointed by 68 broiler chickens with cellulitis and the group controls, for 60 broilers chickens without the disease. While being collected, the bags were measured in bursometer and registered in accordance with his scale. After the macroscopic examination there were collected fragments from skin (harmed and it integrates), it wrinkles of Fabricius and the spleen. The bursa and the spleen were distributed, a part conditioned in 10% phormol and another part conditioned in ice for subsequent freezing. The fragments from skin harmed and integrate, leave from the bag and it leaves from the spleen when they were conditioned in 10 % phormol, they passed by the processing of usual techniques, for inclusion in paraffin, and coloration in H.E, in service of Pathological Anatomy of the Federal University From the state of Rio de Janeiro (UFF). The bursa and the spleen kept cool were taken to the laboratory of Molecular Epidemiology of the UFF to subsequent processing of the bursa by the technique of RT-PCR. A score was created for histological analysis of the injuries of the bags with the next criteria: score 0 – without injury; score 1 – discreet hyperplasia and rarefaction lymphoid of follicles; 2 – edema permeated inflammatory, necrosis of follicles, rarefaction lymphoid severe and discreet atrophy of follicles; score 3 – presence of follicular cysts and epithelial, severe atrophy of follicles and fibrosis. The statistical analysis was carried out by the tests of Qui-square Kruskal-Wallys and Right Qui-square of Fischer. Microscopically all the injuries of the group if they were confirmed as cellulitis. Regarding the microscopic of the bursa of Fabricius they were found one bursa with score 0; three, with score 1; 25, with score 2; and 99, with score 3. In the realization of the RT-PCR for the virus of the DIB the group if he presented 22 positive samples, and the group controls nine positive samples. There was statistical difference between the groups case and control regarding the gravity of the injuries of bursa of Fabricius. For the analysis of Risk, the presence of the virus of the DIB favored the appearance of cellulitis. Yellowish injuries under the skin in plaques in the subcutaneous of broiler chickens must be considered as a cellulitis. The presence of the virus of the DIB favored the presence of cellulites.

Key-words: Broiler chickens, bursa of Fabricius, cellulitis, histopatology, RT-PCR.

1 INTRODUÇÃO

O Brasil vem ocupando lugar de destaque no cenário avícola mundial, setor altamente competitivo onde a redução do custo de produção tem sido determinante para o crescimento das empresas. Este fato está levando os profissionais do setor avícola a manter um alto nível sanitário de seus plantéis para poder usufruir a máxima performance das aves, melhorando a rentabilidade do produto final (LEFFER, 2004) A grande alavancada da avicultura comercial brasileira se deu a partir de avanços na área do melhoramento genético, introdução do sistema de produção integrado, nutrição balanceada, manejo adequado, controle sanitário e qualidade da carne e dos ovos

Em 2007 foram consumidas, no mundo, aproximadamente 85,5 milhões de toneladas de carnes avícolas representadas na maioria pela carne de frango (mais de 95% do total). A Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) e a Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE), em trabalho conjunto, estimam que por volta de 2014 o consumo chegue aos 100 milhões de toneladas, alcançando perto de 106 milhões de toneladas em 2017(ABEF, 2008).

O abate é realizado em frigoríficos altamente tecnificados, sendo adotadas praticas de higiene rigorosa. O país em 2008 alcançou uma receita de US\$ 6,5 bilhões com as exportações avícolas segundo dado da Associação Brasileira dos Produtores e Exportadores de Frango (ABEF, 2008).

O Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento pela Portaria número 1428/93, instituiu a utilização de programas como Análise de Perigos e Ponto Crítico de Controle como ferramenta para inspeção de todo o processo de produção na indústria de alimentos. Com isso as indústrias vêm adotando programas de garantia da

qualidade, assim como outros procedimentos sugeridos pelo Codex Alimentarius, órgão da FAO encarregado de elaborar normas para a produção de alimentos (LIMA et al., 2007).

Apesar desse desenvolvimento e de ser considerada com bom nível sanitário, a avicultura brasileira ainda tem preocupações com doenças que acometem os planteis nacionais. Doenças imunossupressoras como a doença infecciosa da bolsa de Fabrício (DIB), que acomete principalmente aves jovens e que leva a um quadro de imunossupressão, vêm preocupando os sanitaristas.

A DIB é uma doença viral aguda, altamente contagiosa, que afeta aves jovens. As aves afetadas apresentam o seguinte quadro: depressão, anorexia, diarreia mucóide, morbidade e mortalidade altas (LUKERT; SAIF, 1991) Nos últimos anos, novos surtos da doença tem sido uma preocupação mundial discutida pelos pesquisadores. Em razão disto o diagnóstico rápido e preciso da doença é muito importante. O diagnóstico mais completo para a DIB deve envolver histórico do lote, sinais clínicos, lesões e técnicas laboratoriais, devendo ser baseado em exames histopatológicos, sorológicos, isolamento viral e técnicas moleculares (RODRIGUES; PEREIRA, 2001).

Em relação à etiopatogenia da DIB devem-se levar em consideração dois itens. O primeiro se refere a algumas cepas virais que podem causar mortalidade de 20 a 40% em frangos de três semanas ou mais velhas. O segundo, e o mais importante, é a imunossupressão severa e prolongada de galinhas infectadas no início da vida que tem sido associada com o favorecimento a outras enfermidades como dermatite gangrenosa, hepatite por corpúsculo de inclusão (síndrome anêmica), falha na resposta às vacinações e infecções por *E. coli* podendo levar a lesões de pele como a celulite (LUKERT, 1993a).

Podemos destacar a celulite como uma das doenças mais importantes, dentre as inúmeras que provocam lesões na pele dos frangos de corte, principalmente por causar elevados prejuízos em função da condenação parcial ou total das carcaças em abatedouros do mundo todo (FALLAVENA, 2005). O número de condenações de frangos por celulite vem aumentando nos últimos anos. Este trabalho foi realizado com o objetivo de identificar a doença Infecciosa da bolsa de Fabrício pela anatomopatologia

e RT-PCR e sua relação com a celulite em frangos de corte sob Inspeção Sanitária Federal.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PRODUÇÃO E COMERCIALIZAÇÃO DA CARNE DE FRANGO

A avicultura foi a atividade agropecuária que mais evoluiu nos últimos 40 anos. Este desenvolvimento teve como suporte o melhoramento constante do potencial genético, da nutrição, do manejo e da sanidade das aves, das instalações, dos equipamentos, do processamento e da comercialização da carne. Este melhoramento tem possibilitado o crescimento contínuo do número de aves produzidas, maior rendimento de abate, melhor eficiência produtiva, inovações mercadológicas, desenvolvimento de novos produtos, redução real dos preços e um aumento linear do consumo de carne de frango (BAIÃO et al., 2008).

Em 2008, com a expectativa de produção de 11 milhões de toneladas, respondendo por 45% das exportações mundiais, o Brasil continua como o terceiro maior produtor de carne de frango, atrás apenas de Estados Unidos (16,5 milhões de toneladas) e da China (12,5 milhões), dois dos principais exportadores desse produto. O sucesso da carne de frango brasileira é tão grande que ela é consumida em mais de 150 países. Neste ano, o setor assegurará uma receita cambial de US\$ 7 bilhões ao Brasil. Assim, o frango ganha cada vez mais espaço na balança comercial, gerando lucros, empregos e movimentando os portos brasileiros

Diante deste contexto de crescimento e desenvolvimento da avicultura brasileira, a sanidade dos planteis é um fator que merece destaque. A garantia sanitária é fundamental para preservar a saúde pública e dos plantéis. Sendo assim, foram criadas

regras sanitárias para comercialização e punições, ou barreiras, para aqueles que as violam. O diagnóstico correto, clínico e laboratorial e os monitoramentos sanitários assumem importância crucial. Apesar de todos os avanços nessa área alguns problemas sanitários ainda preocupam os especialistas, como o quadro de imunossupressão que favorece o aumento de problemas respiratórios, lesões cutâneas, caquexia entre outros (SALLE, 2008).

2.2 DOENÇA INFECCIOSA DA BOLSA DE FABRÍCIO (DIB)

2.2.1 Histórico

A Doença Infecciosa da Bolsa (DIB) foi descrita pela primeira vez em 1962 por Cosgrove e os primeiros surtos desta doença ocorreram ao redor da cidade de Gumboro, no estado de Delaware, Estados Unidos da América (EUA). A DIB é uma doença viral aguda, altamente contagiosa, que afeta aves jovens (MONTASSIER, 2001; LUKERT; SAIF, 1991). A doença foi caracterizada por depressão, anorexia, diarreia mucóide, morbidade e mortalidade altas (LUKERT; SAIF, 1991)

Nas décadas de 60 e 70, a doença foi diagnosticada em diferentes partes dos EUA, com manifestações clínicas em aves de até três semanas de idade e infecção acompanhada de severa imunossupressão em aves com idade acima de três semanas (LUKERT, 1993a)

Na década de 80, foram isoladas variantes do vírus nos EUA e surgiu a hipótese de que as vacinas comerciais, preparadas a partir de cepa clássica, não estariam protegendo convenientemente contra essas variantes. Saif e colaboradores (1984) e Rosenberger e colaboradores (1985) isolaram variantes antigênicas do vírus da DIB que eram a causa aparente destes problemas no campo. O que ocorria era que estas variantes antigênicas venciam a barreira de anticorpos maternos antes que as vacinas produzidas com as chamadas cepas intermediárias fossem administradas. Demonstrou-se que estas variantes tinham apenas de 10 a 20% de similaridade com as cepas padrões do vírus da DIB utilizadas na fabricação de vacinas (LUKERT, 1993a).

Na Inglaterra foi descrito, em 1987, o isolamento de uma cepa altamente virulenta (vvVDIB), que provocava mortalidade de aproximadamente 70% em planteis de postura de três a 16 semanas de idade. Em linhagens de matrizes com três a sete semanas de idade, a mortalidade provocada pelo vírus era de aproximadamente 30%. Em 1988, o vvVDIB se disseminou rapidamente na Holanda, Bélgica, Alemanha, norte da França, África do sul e Israel. Esta cepa variante vence a barreira de imunidade passiva com altos títulos de anticorpos e provocava mortalidade muito alta (80 a 100%). Atualmente os vvVDIB estão disseminados em todo o mundo, mas não foram descritos, nos EUA (KOUWENHOVEN, 1993)

No Brasil, até meados da década de 90, a doença era predominantemente sub-clínica. As vacinas comerciais conferiam proteção satisfatória (LEFFER, 2004). Desde 1997, surtos da doença provocados por uma cepa virulenta de alta patogenicidade, similar às cepas virulentas européias vem aparecendo em todos os estados produtores de frangos de corte e em algumas regiões de criação intensiva de poedeiras comerciais (DI FABIO, 2001). A mortalidade média varia de 5% a 20% em frangos de corte e de 15% a 50% em poedeiras.

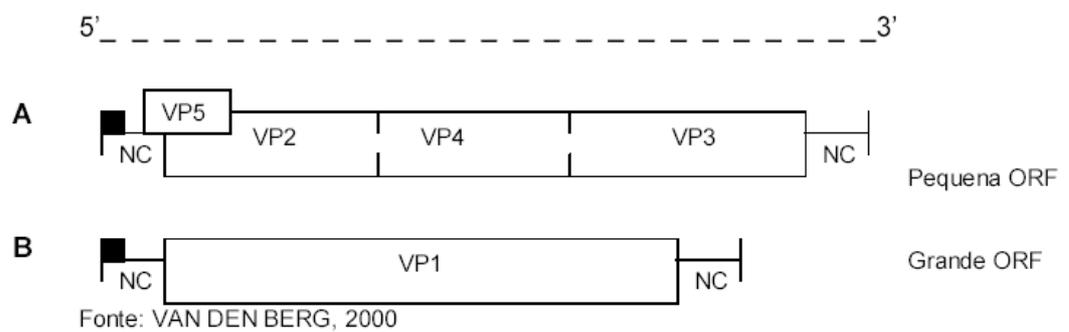
2.2.2 O Vírus

O vírus da DIB (VDIB) afeta o tecido linfóide, principalmente a bolsa de Fabrício, causando imunodepressão nas aves e favorecendo o aparecimento de enfermidades secundárias responsáveis por inúmeros prejuízos na indústria avícola (VAN DEN BERG; ETERRADOSSI, 2001)

O vírus da DIB é um membro da família *Birnaviridae*. Seu genoma é constituído por dois segmentos de RNA dupla fita. As partículas virais não são envelopadas e possuem simetria icosaédrica. O vírus é constituído por cinco proteínas estruturais sendo elas: VP1, VP2, VP3, VP4 e VP5 (Figura 1) O menor segmento genômico é denominado B e codifica VP1, enquanto o maior segmento, denominado de A, codifica VP2, VP3, VP4 e VP5. As proteínas principais do capsídeo viral, VP2 e VP3, representam 51% e 40% do total de proteínas, respectivamente. As menores, VP1 e VP4, representam respectivamente 3% e 6%, sendo que VP2 expressa os epítomos

sorotipo-específicos, enquanto VP3 apresenta epítomos grupo-específicos. (VAN DEN BERG, 2000; MONTASSIER, 2001). As cepas ou tipos de cada sorotipo são resultantes de mutação genética que ocorre nos aminoácidos localizados principalmente em VP2, a maior proteína responsável pela resposta imune protetora contra a DIB (MONTASSIER, 2001). Muitas dessas estruturas e seqüências são essenciais para viabilidade do vírus da DIB, enquanto outras são específicas para algumas cepas e tipos, incluindo sorotipos e patotipos. Cada modificação na organização genética destas estruturas e da regulação protéica e/ou das seqüências pode influenciar o ciclo viral, a especificidade para o hospedeiro e a virulência da cepa (VAN DEN BERG; ETERRADOSSI, 2001)

FIGURA 1: Estrutura e Organização do Genoma do VDIB



São conhecidos dois sorotipos do vírus da DIB. O primeiro que infecta principalmente galinhas e raramente perus e é responsável pela DIB (ITO et al., 2006). Um grande número de variantes antigênicas do sorotipo 1 foi identificado pela técnica de vírus neutralização (MONTASSIER, 2001). As amostras, dentro de um mesmo sorotipo, podem ser descritas como variantes antigênicas, causando somente imunossupressão e doença subclínica, ou variantes patogênicas, com manifestação clássica da doença e mortalidade elevada. O sorotipo 2, foi descrito por Mc Ferran et al., (1980), primeiramente em perus e depois em galinhas. É menos virulento que o primeiro sorotipo ou até avirulento.

O vírus da DIB possui distribuição mundial, sendo bastante resistente a uma grande variedade de desinfetantes. Resiste a pH ácido e temperatura até 56° C. Pode permanecer por 122 dias no galpão após a retirada de aves contaminadas e pelo menos 52 dias nos alimentos, água e fezes. É muito estável, mesmo em condições

adversas dos ambientes, o que favorece sua persistência por longos períodos de tempo mesmo após desinfecção (MONTASSIER, 2001; SIMON; ISHIZUKA, 2000).

Já foram demonstradas evidências sorológicas de infecção pelo vírus da DIB em galinhas, perus, patos. No entanto, a doença clínica só ocorre em galinhas, embora lesões microscópicas tenham sido encontradas algumas vezes nessas outras espécies aviárias, infectadas por esse vírus (JOHNSON et al., 1980; Mc FERRAN, et al. 1980)

2.2.3 Patogenia

A porta de entrada mais comum do vírus é a mucosa oral. No trato digestivo, o vírus da DIB atinge o intestino e é transportado para outros tecidos por macrófagos, podendo ser encontrados antígenos virais no fígado e nos rins. Poucas horas depois da infecção uma grande replicação viral ocorre na bolsa de Fabrício (LUKERT; SAIF, 1991)

Estudos demonstraram que as células alvo da infecção primária pelo vírus da DIB são os linfócitos B com IgM de superfície. São células B adultas responsáveis diretas pelo reconhecimento dos antígenos e geração de respostas imunes humorais. A destruição destes linfócitos é mais pronunciada na bolsa de Fabrício, porém há evidências de replicação viral e efeitos citolíticos nas células B de órgãos linfóides secundários, como as tonsilas cecais e o baço. Esse efeito citolítico do vírus sobre células B leva a uma diminuição significativa nas células B Ig M que estão presentes na circulação sanguínea. Como consequência principal, os animais afetados pelo vírus passam a produzir menores quantidades de anticorpos contra vários antígenos de agentes infecciosos ou não, ficando assim suscetíveis a diversos tipos de infecções e sem condições de resposta a esses agentes. As respostas imunes primárias são afetadas após a infecção com o vírus, mas as respostas imunes secundárias permanecem funcionando normalmente. A deficiência de imunidade humoral induzida pelo vírus é reversível e as aves recuperam a capacidade de produzir anticorpos a partir de 12 semanas pós-desafio (MONTASSIER, 2001).

Existem evidências crescentes a respeito dos efeitos deletérios induzidos pelo vírus da DIB sobre o comportamento normal das células T, apesar de haver algumas controvérsias. No entanto dados de experimentação in vitro, demonstraram que ocorre a inibição na blastogênese de linfócitos T, que ocorre nos primeiros dias após infecção e

posteriormente o comportamento funcional da célula retorna ao normal. Durante o período de inibição da atividade blastogênica, as células T de aves infectadas não secretam Interleucina -2, responsável pelo crescimento e sobrevivência de células T. O mecanismo exato que leva os macrófagos de aves infectadas com o vírus a expressar efeitos supressores da atividade blastogênica de linfócitos T precisa ser mais bem investigado (MONTASSIER, 2001; ITO et al., 2006)

2.2.4 Sinais clínicos

A DIB pode ser classificada basicamente de duas formas: aguda e subclínica. A forma aguda da doença apresenta um quadro de depressão, anorexia, diarreia mucóide, alta morbidade e mortalidade relativamente alta. À necropsia podemos observar hemorragias intramusculares nas pernas, coxas, peito; hemorragia, edema, aumento da bolsa, musculatura escurecida (aves desidratadas), rim com descoloração, baço com aumento de volume, timo com redução de volume (LUKERT; SAIF, 1991; SIMON; ISHIZUKA, 2000; MORALES, 2009). A forma subclínica pode ocasionar maiores perdas econômicas e problemas devido à imunossupressão que se instala após a infecção. As maiores conseqüências dessa imunossupressão são as respostas reduzidas a vacinação e aumento da suscetibilidade as infecções secundárias, como os problemas respiratórios e de pele. O efeito imunossupressor do vírus da DIB pode ser verificado na inspeção no matadouro, onde as perdas por caquexia, aerosaculite, septicemia-toxemia, doenças de pele como celulite e outras afecções tem suas elevações (ROSALES, 1995; FALLAVENA, 2001). Se a DIB ocorrer concomitantemente com outras doenças imunossupressoras como doença de Marek, anemia infecciosa das galinhas, leucose aviária, reovirose e adenovirose, as conseqüências ou perdas serão muito maiores (LUKERT; SAIF, 1991).

2.2.5 Diagnóstico

O diagnóstico da DIB envolve o histórico do lote, sinais clínicos, lesões e técnicas laboratoriais e devem ser baseados em exames histopatológicos, sorológicos, isolamento viral e técnicas moleculares (RODRIGUES; PEREIRA, 2001; MORALES, 2009).

2.2.5.1 Anatomia patológica

Para monitorarmos os programas de vacinação contra DIB e/ou no auxílio ao diagnóstico podemos realizar o estudo da bolsa de Fabrício, pelo seu aspecto macroscópico e microscópico.

Como forma de medir o diâmetro da bolsa de Fabrício e avaliar possíveis alterações no tamanho, pode-se usar o bursômetro. Trata-se de uma régua que possui orifícios numerados de 1 a 8 que medem, respectivamente, 4mm, 7mm, 10mm, 13mm, 16mm; 19mm, 22mm, 25mm de diâmetro. A avaliação da bolsa de Fabrício deve ser criteriosa, não se forçando a passagem do órgão pelos orifícios, devendo passar normalmente, caso isto não ocorra, deve ser colocada no orifício seguinte (BERNARDINO, 2004).

A macroscopia da bolsa de Fabrício permite avaliar possíveis lesões compatíveis com a ação do vírus da DIB (BERNARDINO, 2004). Macroscopicamente a bolsa se apresenta aumentada de volume devido ao edema e a hiperemia, com uma camada gelatinosa amarela e estrias longitudinais salientes que evoluem para uma degeneração do tecido linfóide da bolsa e total redução do seu volume. Pode-se visualizar hemorragia na superfície interna e na serosa (BORDIN, 2001)

O diagnóstico anatomopatológico da DIB passa, no entender da maioria dos especialistas, necessariamente pela histopatologia da bolsa de Fabrício e preferencialmente pela patologia tímico-esplênica. Cepas virulentas, de campo ou não, podem lesionar todos os folículos. Assim, nos estágios mais agudos da doença, microscopicamente ocorre uma extensiva necrose de parênquima linfóide, quando então se observam alterações regressivas nucleares intensas, notadamente picnose. Um fluido protéico pode ser evidenciado na porção medular, assim como formação de cavidades pseudocísticas. Nos casos menos severos ou causados por cepas não tão virulentas, não

é raro encontrar folículos lesados e folículos normais, ou então graus variados de alterações foliculares regressivas. Em alguns momentos o percentual de folículos normais é maior que os lesados (BORDIN, 2001). O exame microscópico da bolsa de Fabrício é uma ferramenta importante para classificação da severidade das lesões histológicas causadas pelo vírus da DIB. Microscopicamente, os efeitos do vírus são, principalmente, alteração na arquitetura folicular em consequência da degeneração e necrose da região medular dos folículos (RODRIGUES; PEREIRA, 2001). Além disso, podem ser encontradas células apoptóticas na região central dos folículos. Recentes estudos demonstraram que a imunodepressão induzida pelo vírus da DIB é em parte devido a apoptose e que as proteínas virais VP2 e VP5 possuem uma estreita relação com este fenômeno (VAN DEN BERG, 2001).

Tanimura et al (1995) realizaram um experimento com três cepas diferentes do vírus da DIB, uma moderada e as outras duas muito virulentas. As cepas foram administradas por via oral, em quatro grupos de 30 aves livres de patógenos (SPF). O objetivo do estudo foi correlacionar a patogenicidade do vírus da DIB com a distribuição do antígeno viral. Observaram necrose no folículo linfóide, infiltrado inflamatório com presença de heterófilos e edema do primeiro ao terceiro dia após a inoculação. Todas as cepas causaram severa atrofia na bolsa, pela depleção de células linfóides nos 13 dias em que duraram as observações. Foi concluído que a patogenicidade das cepas de campo do vírus da DIB estava correlacionada com o aparecimento de lesões em órgãos linfopoiéticos e não só na bolsa de Fabrício, podendo estar associada com a distribuição do antígeno viral nesses mesmos órgãos.

Pereira et al. (2003) desenvolveram um estudo relacionando diâmetro na escala do bursômetro com escores histopatológicos em bolsas de Fabrício de frangos de corte aos 28 dias de idade. Os escores de diâmetro da bolsa tinham a seguinte nomenclatura NIB, bolsa não imunizada; VB, bolsa devidamente vacinada e DB, bolsa com escore de diâmetro compatível com desafio de campo. Os escores histopatológicos foram adaptados de Muskett, et al. (1979) e Stewart-Browne Trampel, (1990), onde: NH indicava bolsa de Fabrício com histologia normal; VH indicava bolsa de Fabrício com depleção linfóide compatível com a ação da vacina intermediária contra a DIB e DH indicava lesões histopatológicas compatíveis com a DIB (depleção, necrose, edema, hiperemia, áreas

hemorrágicas, cistos). Os pesquisadores observaram que 78,96% das aves examinadas apresentavam escore de diâmetro de bolsa de Fabrício vacinal (VB). Pelo escore histopatológico, 62,76% das aves examinadas foram compatíveis com alterações microscópicas provocadas pela vacina intermediária (VH). A maior diferença entre o diâmetro e a histopatologia da bolsa de Fabrício ocorreu nos casos em que as aves apresentaram bolsa de Fabrício com escore histológico compatível com a doença (DH). Quando as aves apresentaram DH, 89% apresentaram diâmetro de bolsa compatível com vacina, o que gerou certa confusão, caso fosse utilizada apenas uma dessas técnicas para diagnóstico.

Bolis et al. (2003) realizaram um trabalho com pintos comerciais divididos em quatro grupos (T1, T2, T3 e T4). O grupo T1 não recebeu vacina, nem desafio. Os demais grupos foram vacinados no primeiro dia de idade contra a DIB, e os grupos T3 e T4 receberam aos 14 dias de idade, uma vacina forte e uma intermediária “plus”, respectivamente. Com 21 dias de idade os grupos T2, T3 e T4 foram desafiados com uma cepa muito virulenta da DIB. Foi montado um escore de 0 a 6 para classificar as lesões microscópicas nas bolsas de Fabrício a partir do sétimo dia de idade. O escore 0 - revelava que não havia alteração na bolsa; escore 1 - discreta dissociação do tecido conjuntivo, rarefação linfóide na área medular; escore 2 - degeneração e/ou linfócitos, plasmocitos ou macrófagos associados com discreta infiltração inflamatória; escore 3 - depleção linfóide da medular e cortical e/ou intensa degeneração das células do folículo linfóide associada com discreto edema e infiltração inflamatória, discreta invaginação epitelial e hiperplasia linfóide perivascular; escore 4 - degeneração das células da medular e cortical com moderado infiltrado inflamatório no interstício e camada epitelial ou depleção dos folículos linfóides, fibroplasia e alguns focos de invaginação epitelial; escore 5 - necrose medular com formação cística, infiltrado inflamatório com presença de granulócitos no parênquima e/ou necrose com hemorragia no interstício ou folículo linfóide, e/ou folículo linfóide com invaginação epitelial ou fibrose ou intensa fibroplasia intersticial; escore 6 - ausência de folículos linfóides devido a hemorragia e necrose, atrofia ou fibrose. As aves dos grupos T2 e T4 tiveram lesões intensas na bolsa de Fabrício (acima do escore 4) dos 28 aos 42 dias de idade, o que demonstrou que não estavam protegidas contra a ação do vírus muito virulento.

No estudo realizado por Pereira (2004), ao mensurar bolsas de Fabrício de 130 frangos de corte ao abate constatou que 44 possuíam tamanho 3 (10mm de diâmetro); 61, tamanho 4 (13 mm de diâmetro); 17, tamanho 5 (16mm de diâmetro); sete tamanho 6 (19 mm de diâmetro); e uma tamanho 7 (22mm de diâmetro). Os 130 frangos apresentaram lesões microscópicas na bolsa de Fabrício em maior ou menor grau de severidade a saber: lesões severas (escore 3) com intensa destruição folicular, formação de cistos foliculares e epiteliais, necrose e fibrose na bolsa de Fabrício foram observadas em 58 frangos; edema e depleção linfóide (escore 2) com atrofia folicular foram observados em 48 aves; e 24 aves apresentaram depleção linfocitária discreta na bolsa, mas mantiveram a arquitetura do folículo (escore 1). Não houve uma relação entre a gravidade das lesões nas bolsas de Fabrício e o tamanho da bolsa, mas a doença favoreceu o aparecimento de outras enfermidades como: coccidiose, aerossaculite, lesão na cabeça do fêmur, pericardite, verminose, enfermidades que depreciam o peso, afetando a qualidade das aves ao abate.

2.2.5.2 Sorologia

O monitoramento sorológico pressupõe avaliar a eficiência dos programas vacinais, a vacina utilizada e o manejo de vacinação, além de auxiliar no diagnóstico e traçar um perfil imunológico dos plantéis. Como a DIB é uma doença de aves jovens, a vacinação e a infecção podem estar muito próximas num momento que as aves, muitas vezes, não têm experiência imunológica suficiente para responder de forma mais intensa a estas agressões antigênicas, sendo então a produção de anticorpos muito pobre neste curto período pós-infecção. Com esta dificuldade, a avaliação sorológica deve ser feita com critérios bem definidos (DI FABIO, 2001).

Várias provas sorológicas podem ser utilizadas para a detecção de anticorpos ou antígenos da DIB como: Agar - gel precipitação (AGP), soroneutralização (SN) e ELISA. Todas elas possuem vantagens e limitações. A diversidade dos antígenos usados nos testes sorológicos é grande, existindo diferença na especificidade e sensibilidade dos mesmos, sendo assim não é possível correlacionar testes diferentes (JACKWOOD; JACKWOOD, 1994). Um teste sorológico ideal deveria ter sensibilidade e especificidade máximas, simplicidade, praticidade, baixo custo e precisão e exatidão máximas (BRIGGS et al., 1986; DI FABIO, 2001;).

A prova de ELISA tem sido empregada para fins de tipificação viral, utilizando bateria de anticorpos monoclonais que estão bem caracterizados quanto aos epitopos específicos contra os quais reagem, possibilitando não apenas identificar o vírus, como também distinguir as diferenças entre cepas variantes e cepa clássica. A cepa clássica foi reconhecida por três anticorpos monoclonais neutralizantes (R63, B69, e 179), dirigidos contra diferentes epitopos. As cepas variantes Delaware não possuem o epitopo B 69, o que permitiu diferenciá-la da cepa clássica. Outras cepas variantes, como aquela isolada em 1987, não eram reconhecidas pelo anticorpo R63. Em 1988, foi isolada uma cepa que não reagiu com o anticorpo 179, indicando a perda de outro epitopo neutralizante, comparativamente a cepa padrão (ROSALES,1995; SAIF,1995).

O ELISA é o teste sorológico mais usado para detecção de anticorpos contra o vírus da DIB. O ELISA tem a vantagem de ser um teste rápido com resultados facilmente analisados por programa de computador. Com estes programas pode se estabelecer um perfil de anticorpos de lotes reprodutores que vai indicar os níveis de imunidade e fornecer informações para o desenvolvimento de programas de imunização apropriados, tanto para os reprodutores, como para sua progênie (DE HERDT et al.,2000; KNOBLICK et al., 2000).

2.2.5.3 RT- PCR

A identificação do vírus da DIB pela técnica molecular tem sido utilizada por vários pesquisadores (JACKWOOD; JACKWOOD, 1994; JACKWOOD; JACKWOOD, 1997; IKUTA, 2001; BOLIS et al., 2003).

Existem diferentes formas de identificar e isolar as cepas do vírus da DIB. Dentre as metodologias descritas, existe consenso de que a análise da região variável do antígeno VP2 é alvo indicado para discriminação dos diferentes vírus da DIBs. Esta região é responsável pela indução de anticorpos protetores, e base para diferenciação dos patótipos e subtipos virais, pois apresenta polimorfismo consistente, e boa correlação com subtipos caracterizados por vírus-neutralização (IKUTA, 2001). 28

Jackwood e Jackwood (1994) desenvolveram a técnica de transcrição reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) acoplada à digestão com enzimas de restrição para diferenciação de variantes antigênicas encontradas nos EUA.

Diversos autores realizaram estudos através da técnica de RT-PCR e análise com RFLP (corte com enzima de restrição) da região variável ou hipervariável do gene que codifica a proteína VP2, com objetivo de classificar ou tipificar amostras do vírus, (JACKWOOD; JACKWOOD,1994; IKUTA et al., 2001; VAN DERNBERG, 2000). Em um estudo da região do VP2 do vírus clássico muito virulento, foi observado que esta proteína não induziu nem morbidade e nem mortalidade em frangos, sugerindo que o fenótipo muito virulento não é determinado somente pela proteína VP2 do vírus. A diferença entre amostras muito virulentas e clássicas é alta na VP2, mas aparece também na VP3, na VP4 e na VP1. Isto nos mostra que poderemos estudar as outras regiões do vírus para que nos auxilie no processo de diferenciação (BOOT et al., 2000)

O estudo realizado por Majó et al. (2002) isolou e caracterizou nove amostras do vírus da DIB procedentes da Espanha. Para isso estudaram 248pb da região hipervariável do gene que codifica a proteína VP2. Depois da realização da técnica de RT-PCR os produtos foram tratados com enzimas de restrição sendo elas: BstNI, SacI, SspI, TaqI, DraI e StyI. Também foram realizadas as análises das seqüências de nucleotídeo e se comparou com as seqüências previamente publicadas. Foram identificadas cepas clássicas e muito virulentas do vírus da DIB e nenhuma mostrou características moleculares similares às variantes antigênicas prevalentes nos Estados Unidos. Tessari e colaboradores (2001) relataram a ocorrência da DIB em aves de postura com cinco semanas de idade, provenientes da região de Itirapina SP, causadas por cepas hipervirulentas provocando mortalidade de 50-60% no lote. Foi utilizada para

diagnóstico a técnica de genotipagem por PCR/RFLP, baseada no método descrito por Jackwood et. al. (1994). Concluíram pela necessidade do desenvolvimento de novas vacinas que protejam as aves expostas ao vírus de campo, uma vez que a DIB causa grandes prejuízos econômicos para a indústria avícola mundial.

29

2.2.6 Prevenção e Controle

Em relação ao controle da DIB, de maneira geral, há duas formas de medidas profiláticas que devem ocorrer simultaneamente. Uma é a forma inespecífica de prevenção relacionada a fatores de biossegurança e a outra, específica, é a vacinação (LEFFER, 2004).

Em relação aos fatores de biossegurança podemos citar todas aquelas medidas gerais de prevenção como localização e isolamento da propriedade, treinamento de funcionários, higienização adequada de instalações e equipamentos, controle de roedores, controle da qualidade da água, armazenamento adequado de rações entre outras medidas que devem ser tomadas para se ter uma produção de qualidade e que gere lucros (ITO et al., 2006).

A vacinação contra a DIB deve ser feita com muito cuidado, pois é um trabalho difícil. A imunização de reprodutoras é especialmente importante para que ocorra a transmissão adequada de proteção. A imunização passiva é aquela transferida da mãe para os pintinhos através da gema do ovo, que é capaz de proteger contra infecções imunossupressoras precoces. Esses anticorpos são elaborados pela galinha em consequência de infecção natural ou da vacinação. Quanto melhor for a vacinação da galinha, maiores serão os títulos de anticorpos que os pintinhos receberão passivamente, refletindo na uniformidade da imunidade populacional. A imunidade passiva de pintinhos oriundos de reprodutoras vacinadas perdura por uma a três semanas, e se tiverem recebido dose de reforço com vacina em adjuvante oleoso, a imunidade passiva poderá estender-se por quatro a cinco semanas (SIMON; ISHIZUKA, 2000). Devemos ressaltar que existe interferência de anticorpos maternos (AcM) na eficiência da resposta vacinal (LUKERT, 1994; KREAGER, 1994;).

Os extensivos exames sorológicos realizados em muitos plantéis de frangos de corte e de poedeiras de reposição realçaram um grande problema, que é a variação dos títulos de anticorpos em pintos recém-eclodidos. Isto foi o resultado de diferenças existentes entre os plantéis de origem e até mesmo dentro de um mesmo plantel. Esta diversificação é o resultado de uma grande variação diária na quantidade de anticorpos transmitidos pelas reprodutoras aos ovosférteis. Devido a esta variabilidade, freqüentemente não é possível determinar com precisão a idade exata de 30 vacinação de um lote completo, principalmente quando este é composto de pintos provenientes de dois ou mais lotes de reprodutoras, com uma concentração muito variável de anticorpos maternos (KOUWENHOVEN, 1993). A vacinação no primeiro dia de vida das aves em progênie de matrizes vacinadas não é suficiente para proteger os animais por toda a vida. A interferência dos anticorpos maternos influencia no esquema de vacinação utilizado e a vacina só consegue ultrapassar a barreira de anticorpos para atingir a bolsa de Fabrício, gerando uma resposta ativa, quando esta barreira estiver num determinado nível e varia de acordo com o tipo de vacina. Os anticorpos maternos são essenciais para proteger as aves nos seus primeiros dias de vida contra o desafio de campo, porém esta imunidade interfere na ação dos vírus vacinais interferindo no sucesso da vacinação (BERNARDINO, 2001).

Para frangos de corte, o melhor período para vacinação vai depender dos níveis dos títulos de imunidade materna, via de aplicação e da virulência da cepa vacinal. Não existe um programa padrão a ser recomendado para controle da DIB. Deve-se vacinar os frangos mais de uma vez para melhorar a cobertura vacinal dentro dos lotes aumentando assim a possibilidade de que a vacinação não sofra a interferência dos AcM (BERNARDINO, 2001; CARDOSO; PEREIRA, 2001). As vacinas para o sorotipo 1 clássico são capazes de promover uma boa proteção, mas o problema é correlacionar os níveis de anticorpos maternos com o calendário de vacinação. Num futuro próximo deve-se trabalhar no desenvolvimento de vacinas seguras que transmitam aos animais uma proteção durante todo o seu crescimento (VAN DEN BERG, 2000).

2.3 ANEMIA INFECCIOSA DAS GALINHAS

A anemia infecciosa das galinhas é uma doença de aves jovens, caracterizada por marcada anemia, aplasia de medula óssea, mortalidade variável, atrofia generalizada de órgãos linfóides, retardo no crescimento e imunossupressão. Foi identificada pela primeira vez no Japão por Yuasa (1979). O vírus da anemia infecciosa das galinhas pertence a família *Circoviridae*, recentemente classificado como *Gyrovirus*. Seu genoma consiste de DNA circular de fita simples. O vírus atinge principalmente aves jovens (duas a cinco semanas de idade) causando expressivo impacto na produção. As aves com mais de duas semanas de idade são suscetíveis a infecção, mas não desenvolvem a 31 doença clínica (BRENTANO, 2001)

O vírus da anemia infecciosa das galinhas (CAV) infecta principalmente linfócitos T maduros, assim como linfócitos T contendo receptores CD4 e CD8, o que indica também a infecção de linfócitos T precursores ou imaturos, resultando na depleção destas células (BRENTANO, 2001). Na estrutura do vírus temos a proteína VP3 e esta está associada à indução de apoptose. A apoptose também conhecida como morte celular programada, pode ser induzida na célula por outros fatores como, por exemplo, infecções virais. Os linfócitos B e T são bastante sensíveis a apoptose. A proteína VP3 do CAV, realizando apoptose, exerce importante função na patogenia do vírus. Sua ação resulta na depleção de linfócitos T e conseqüentemente num dos mecanismos de imunossupressão das aves na infecção pelo CAV, afetando, assim, a geração da resposta imune. Lembramos que células T helper 1 secretam interleucina 2 (responsável pelo crescimento e sobrevivência de células T) e interferon gama (estimula os macrófagos na produção de citocinas), promovendo uma resposta por linfócitos T citotóxicos, estes normalmente requeridos para eliminação de patógenos intracelulares como os vírus. Logo a alteração ou depleção na função de linfócitos T CD4+ causada pelo CAV tem conseqüências diretas sobre a efetivação de respostas imunes, tanto celulares como humorais contra outros patógenos. A alteração que o vírus causa em células T CD8+ reduz a capacidade de resposta celular mediada por linfócitos T citotóxicos, dificultando a eliminação do vírus, sendo assim facilitando a ocorrência de infecções crônicas e persistentes. Portanto o CAV tem um importante papel na potencialização da DIB (BRENTANO, 2001; BRENTANO, 2005).

Este conjunto de alterações compromete a função do sistema imune, aumentando a predisposição a infecções oportunistas ou secundárias por outros

microorganismos, como por exemplo, aumento de dermatites, colibacilose, aspergilose entre outros (BRENTANO, 2005).

2.4 CELULITE

2.4.1 Tecido epitelial

32

A pele é a maior estrutura do corpo e nas aves é delgada nas regiões cobertas pelas penas justamente por estar protegida do contato físico com o meio ambiente, por estas estruturas queratinizadas (FALLAVENA, 2001). Ela exerce uma função importante de proteção física aos órgãos internos, servindo também como isolante térmico e representando uma barreira entre o corpo e o ambiente externo, além de funcionar como órgão sensorial através de numerosas terminações nervosas (FALLAVENA, 2000a).

Basicamente a epiderme das aves é muito semelhante nas diversas partes do corpo, mas sua espessura possui certas variações em determinados locais (PASS, 1996). É constituída de uma camada mais externa derivada do ectoderma, a epiderme, e uma mais interna oriunda do mesoderma, a qual constitui a derme e a hipoderme (tecido conjuntivo). A epiderme forma as penas e a camada córnea da pele, enquanto que o principal componente estrutural da derme é a proteína fibrosa, denominada colágeno, juntamente com a elastina. Na derme há vasos sanguíneos e linfáticos, tecido adiposo, nervos, músculo liso e numerosas terminações nervosas principalmente associadas aos folículos das penas. A proteção oleosa necessária é suprida pelo uropígio e pelas células da camada mais superficial da epiderme (queratinócitos). A pele coberta pelas penas está protegida do contato físico com o ambiente, e é mais fina do que aquela presente em locais expostos, como a das patas. As penas são estruturas queratinizadas da epiderme, não contém vasos sanguíneos ou terminações nervosas e o seu crescimento ocorre de forma cíclica, havendo períodos de crescimento e repouso (PASS, 1996; FALLAVENA, 2000b).

2.4.2 Lesões cutâneas

As lesões cutâneas vêm desempenhando importância crescente na criação de frangos de corte em função de fatores inerentes ao processo de criação em escala industrial desse tipo de ave, e os prejuízos econômicos decorrentes das lesões na pele incluem os causados por condenação parcial e total das carcaças nos abatedouros (FALLAVENA, 2000a).

33

As principais doenças que favorecem lesões cutâneas em frangos de corte são celulite, boubá aviária, carcinoma de células escamosas e dermatites inespecíficas. A semelhança entre as lesões macroscópicas dessas doenças torna possível a ocorrência de erros na interpretação dos dados. Dentre os fatores relevantes para o aparecimento de lesões cutâneas, os traumatismos passaram a merecer destaque especial, por representarem portas de entrada para patógenos. Outro fator a considerar é o estado imunológico das aves, pois a pele está constantemente exposta à ação de agentes infecciosos, sendo assim qualquer fator que desencadeie imunossupressão nas aves irá contribuir para o desencadeamento de lesões cutâneas (FALLAVENA, 2001).

2.4.3 Etiopatogenia

A celulite aviária também é conhecida como processo infeccioso inflamatório, “waffle skin” e dermatite necrótica. Foi descrita pela primeira vez em 1984, na Grã-Bretanha por Randall.

Podemos definir a celulite como processo patológico caracterizado pela inflamação purulenta aguda e difusa do tecido subcutâneo, dissecando planos teciduais e podendo envolver camadas musculares. Embora a celulite possa se localizar em qualquer região do corpo, ocorre mais freqüentemente no abdome, sobrecoxas e cabeça (FALLAVENA, 2000b; LECLERC et al., 2003; SILVA; MOTA, 2003;). As celulites nas aves são classificadas em dois tipos, I e II, conforme a localização da área afetada e a extensão da lesão. O tipo I ocorre na região ventral da ave e está relacionada com contaminação no incubatório, devido à ocorrência de onfalite. O tipo II ocorre nas outras regiões do corpo da ave e está associado com lesões de arranhões, que ocorrem durante

o crescimento da ave, pela alta lotação usada nas criações avícolas (NORTON et al.,1997).

A celulite foi relatada em perus em esses relatos confirmados em perus comercializados em “Upper Midwest”, caracterizados por alta mortalidade em toda criação associada a lesões de celulite. A pele dos animais apresentava-se engrossada contendo áreas com lesões. As lesões apareceram de forma aglomerada, com um a dois centímetros de diâmetros e com fluido de coloração amarelada. Houve um acúmulo de fluido gelatinoso na área do peito. A musculatura apresentava petéquias. A região da pata dos animais apresentava uma quantidade de sangue e fluido. 34 Microscopicamente havia hiperqueratose, “debris” celulares e heterofilos. Na derme e subcutâneo observou-se material eosinofílico amorfo depositado entre os feixes de colágeno, também havia presença de infiltrado inflamatório (CARR et al., 1996).

A celulite apresenta uma etiologia multifatorial, havendo uma interação complexa de fatores ligados ao manejo, às aves, e a genética bacteriana. Diversas bactérias têm sido associadas com a celulite, entre elas *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus dysgalactiae*. Entretanto a *Escherichia coli* é a mais freqüentemente isolada e as aves com a doença podem também apresentar lesões típicas como perihepatite, salpingite e artrite (FALLAVENA, 2000b; ANDRADE, 2005). A *Escherichia coli* isolada de lesões de celulite não foi correlacionada como causa de doença em humanos. Entretanto análises genéticas demonstraram que alguns tipos de *Escherichia coli* isoladas de lesões de celulite em frangos de corte foram compatíveis com as que causam septicemia e meningites em humanos (KUMOR, et al., 1998). Para que a celulite ocorra é indispensável que a pele esteja lesada e que uma quantidade grande de bactérias entre em contato com a lesão de modo a invadirem e se multiplicarem no hospedeiro (NORTON et al.,2000).

2.4.4 Prejuízos econômicos

A celulite tem sido uma das principais causas de condenações de carcaças de frangos de corte, sendo considerada uma patologia emergente na avicultura (NORTON et al., 2000)

No Canadá, a celulite é a principal causa de condenação em frangos de corte e estima-se que seja responsável pela condenação de 1,2% dos frangos de corte abatidos (FALLAVENA, 2000b, KUMOR, 1998). Nos EUA, a incidência de celulite aumentou mais de cinco vezes, com estimativa de perda anual superior a 80 milhões de dólares pela condenação de aves (NORTON et al., 2000).

35

Celulite é uma causa crescente de condenação de carcaças, há indicações de que esta deverá ser a maior causa de condenação de carcaças em países de avicultura desenvolvida, mais de 30% das condenações tem sido devido à celulite. Em alguns países, quando as lesões são pequenas e ocupam área total inferior a 48cm², as carcaças sofrem rejeição. As lesões, limitadas e bem definidas entre o esterno e a face interna da coxa, são removidas e as carcaças aproveitadas. (SILVA, 2003)

No Brasil segundo a Normativa nº 210 de 10/11/1998 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, qualquer órgão ou parte da carcaça que estiver afetado por um processo inflamatório deverá ser condenado e, se existir evidência de caráter sistêmico do problema, a carcaça e as vísceras na sua totalidade deverão ser condenadas. Neste contexto a celulite se encaixa como processo inflamatório, sendo assim, são desviadas da linha de inspeção para julgamento e destino adequado, podendo. Podendo ter a condenação parcial ou total da mesma, gerando perdas econômicas de qualquer forma.

Numa estimativa brasileira o abate de 3,63 bilhões de frangos em 2002 considerando uma condenação de 0,9% (total e parcial), e 30% dessas devido a celulite, chegaríamos a 9,720 milhões de carcaças afetadas por celulite por ano, tomando-se os índices de condenação de carcaças por esta afecção em países com avicultura desenvolvida. As perdas são resultantes da rejeição de carcaça, necessidade de redução na velocidade da linha de abate, despesas com equipamentos e mão-de-obra adicionais para recuperação de parte das carcaças e queda do rendimento do processo de abate (SILVA, 2002).

2.4.5 Manejo das aves

Várias pesquisas demonstraram que, para que a celulite ocorra é indispensável que a pele esteja lesada e que bactérias entrem em contato com a lesão, de modo a

invadir e multiplicar-se no hospedeiro. O traumatismo é um dos fatores importantes na etiologia da celulite (FALLAVENA, 2005). A ocorrência de traumatismos, especialmente os arranhões, vem aumentando por causa do incremento na densidade populacional e da utilização de programas de restrição alimentar e de iluminação, já que estes promovem acréscimo na competição pelo alimento e, também, por problemas no empenamento, os quais tornam a pele mais exposta (FALLAVENA, 2001). 36

Outro fator importante é a qualidade da cama, já que a umidade excessiva da mesma resultará em maior ocorrência de celulite. Camas recicladas irão servir de meio de cultura para diversos patógenos, dentre os quais se incluem os causadores de celulite (FALLAVENA, 2001; FALLAVENA, 2005).

Um ponto que também deve ser considerado é o bom funcionamento do sistema imunológico, pois a pele está constantemente exposta a agentes infecciosos. Os frangos de corte hoje em dia, apresentam desempenho muito superior ao obtido no passado, mas ao mesmo tempo, podem apresentar deficiência na resposta imune pois geneticamente, são capazes de desviar uma maior proporção de nutrientes para a produção de carnes as expensas do sistema imune. Assim, todos os fatores que levam à imunossupressão deverão ser minimizados, como é o caso da DIB, anemia infecciosa das galinhas, doença de Marek e leucose (FALLAVENA, 2001).

As medidas para reduzir a ocorrência de celulite poderiam ser resumidas em alguns pontos, tais como: promoção do desenvolvimento das penas; redução da carga bacteriana; diminuição na velocidade de crescimento das aves; decréscimo na presença de fatores estressantes (FALLAVENA, 2005)

2.4.6 Diagnóstico anatomopatológico

O diagnóstico da celulite antes do abate é quase impossível, uma vez que as lesões não são facilmente identificadas sem a exposição do tecido subcutâneo. Isso dificulta o estudo da evolução das lesões (FALLAVENA, 2001).

Macroscopicamente as lesões se caracterizam por aumento na espessura da pele e mudança na coloração desta, a qual pode variar desde amarelo-brilhante, amarelo opaco chegando até a marrom avermelhado. Ao corte há edema subcutâneo,

hemorragias musculares e presença de exsudato (MESSIER et al., 1993; ONDERKA,1997; ANDRADE, 2005; ALVES, 2007). A presença de uma placa fibrinosa entre o tecido muscular e o subcutâneo é considerada característica da doença, mas estas podem não estar presente dificultando o reconhecimento da doença (MESSIER et al., 1993; SILVA; MOTA, 2003; ANDRADE, 2005; ALVES, 2007)

37

Um estudo realizado por Norton et al (2000) reproduziu o quadro de celulite em frangos de corte com 39 dias de idade. Os animais foram infectados com *Escherichia coli* isolada de lesões de celulite. Em 100% das aves infectadas com esta cepa na superfície ventral e dorsal, se desenvolveram placas fibrinocaseosas características desta enfermidade. As lesões encontradas eram: fluido com a coloração variando do amarelo ao laranja que apareceram seis horas após infecção. As lesões progrediram, o fluido ficou mais fino, e a coloração ficou amarelo purulenta e houve o aparecimento das placas, após 12 horas. Com o passar do tempo as placas iam diminuindo, mas apesar disso a maioria das aves desafiadas, examinadas três dias após a infecção, apresentavam placas proeminentes característica da celulite.

Em um estudo, Peighambari et al. (1995) encontraram em frango de corte lesões macroscópicas que eram caracterizadas por apresentar uma placa fibrinosa frouxamente localizada no tecido subcutâneo. Lesões estas muito semelhantes às descritas por Norton e colaboradores (2000).

Microscopicamente observa-se inflamação do tecido subcutâneo, formando freqüentemente massas constituídas de restos celulares necróticos e bandas de fibrina, comumente circundadas por cápsula de tecido conjuntivo contendo heterófilos, linfócitos e macrófagos (PEIGHAMBARI et al.,1995b; FALLAVENA, 2000b; SILVA; MOTA, 2003). Nos casos mais graves a cápsula é circundada por gigantócitos e por uma camada de fibroblastos em proliferação (FALLAVENA, 2000a).

Messier et al (1993) realizaram um estudo no qual microscopicamente, observaram lesões de pele compatíveis com celulite, estas sendo caracterizadas por: hiperqueratose e hiperplasia da epiderme, espessamento fibroso da derme, evidenciando neovascularização, e infiltrado inflamatório difuso de mononucleares e heterófilos. Em alguns cortes observou-se ulceração focal na epiderme e presença de crosta. Houve a presença de granulomas, caracterizados por exsudato fibrinocaseoso no tecido

subcutâneo. Ao redor havia uma camada de células epitelioides e células multinucleadas gigantes e uma fina camada de células mononucleares misturadas com fibroblastos e colágeno. O exsudato no tecido subcutâneo era composto de debris celulares, tecido fibroso, células inflamatórias e colônias gram-negativas. Este estudo confirmou a associação freqüente de *Escherichia coli* com lesões de celulite em frangos de corte.

38

As lesões de pele em frangos de corte assim como a celulite, despertam interesse em função dos prejuízos que acarretam aos produtores, os quais decorrem da condenação parcial ou total das carcaças, da redução no valor do produto final, do aumento do custo da mão-de-obra e da redução na velocidade de processamento industrial (FALLAVENA, 2003; SILVA; MOTA, 2003).

3 MATERIAL E MÉTODO

Foi desenvolvido um estudo epidemiológico de caso-controle em que as aves do grupo caso foram representadas por frangos de corte portadores de celulite e o grupo controle, por frangos sem a enfermidade. As aves casos foram selecionadas após o desvio para julgamento e destino, no momento do abate. As aves controles foram coletadas na linha de inspeção.

3.1 ORIGEM DO MATERIAL

O material coletado foi obtido de um matadouro avícola localizado no oeste do estado de Santa Catarina. O estabelecimento está sob Inspeção Sanitária, e o número de frangos abatidos por dia era de aproximadamente 160.000 animais. O estabelecimento trabalha com o sistema de integração, portanto, todas as aves eram procedentes de granjas de pequenos produtores rurais integrados ou de granjas de cooperativas integradas, com o mesmo padrão de assistência técnica.

3.2 AS AMOSTRAS

Foram estudados 128 (cento e vinte oito) frangos de corte com idade entre 40 e 48 dias de idade, das linhagens Cobb ou Ross, vacinados contra a DIB no décimo quarto dia de vida, via água de bebida. O material foi coletado no período de uma semana, na sala de necropsia do matadouro. O grupo caso foi representado por 68 aves, enquanto o controle foi de 60 aves. Foram coletados fragmentos de pele (lesada e íntegra) que foram acondicionadas em formol a 10% para realização da histopatologia, fragmentos de bolsa de Fabrício e de baço. No momento da coleta as bolsas de Fabrício e os baços foram divididos ao meio e um fragmento foi acondicionado em frasco com formol a 10% para realização da histopatologia. O outro fragmento foi acondicionado em recipiente plástico com a devida identificação e armazenado em freezer (-20°C) para posterior processamento biomolecular.

40

3.3 MENSURAÇÃO DA BOLSA DE FABRÍCIO

As bolsas de Fabrício foram medidas em bursômetro antes de cortadas e acondicionadas em solução de formol a 10%. Os tamanhos das bolsas de Fabrício foram registrados de acordo com a escala do bursômetro e feita a correspondência da numeração da escala com a medida do diâmetro em milímetros: um (4 mm); dois (7 mm); três (10 mm); quatro (13 mm); cinco (16 mm); seis (19 mm); sete (22 mm); oito (25 mm).

3.4 PROCESSAMENTO DOS TECIDOS PARA HISTOPATOLOGIA

Os fragmentos de pele, bolsa de Fabrício e baço em formol a 10% foram devidamente identificados em ficha própria e enviados para o Serviço de Anatomia Patológica Prof. Jefferson Andrade dos Santos na Universidade Federal Fluminense onde foram processados pela técnica habitual por inclusão em parafina.

Todo o material foi clivado e submetido às etapas de processamento, tais como: fixação, clivagem, desidratação, clareamento, impregnação, inclusão, montagem e coloração pela hematoxilina-eosina (H.E).

Baseando-se no escore montado por Pereira (2004), foi criado um escore para análise histopatológica das lesões da bolsa de Fabrício.

Escore 0 – sem lesão

Escore 1 – edema, discreta hiperplasia epitelial, rarefação linfóide folicular e fluído acidófilo.

Escore 2 – infiltrado inflamatório, discreta atrofia numérica de folículos, rarefação linfóide severa e necrose folicular. 41

Escore 3 – atrofia severa de folículos, cistos foliculares e fibrose.

Nos casos de concomitância de lesões de escores diferentes, foram considerados os graus mais elevados.

3.5 RT-PCR e PCR

As bolsas de Fabrício refrigeradas foram encaminhadas para o Laboratório de Epidemiologia Molecular da Universidade Federal Fluminense para realização da RT-PCR do vírus da DIB. As amostras de baços foram encaminhadas para o laboratório de Doenças das Aves da Universidade Federal de Minas Gerais para diagnóstico de Anemia Infecciosa das Galinhas (AIG) pela PCR, para diferencial com o vírus da DIB, com o envio de resultados para avaliação neste trabalho.

3.5.1 Controle positivo

Foram utilizadas duas amostras vacinais comerciais do laboratório BIOVET -SP como controle positivo, constituídas de cepa intermediária (GUMBOR-VET, BIOVET, SP) e a vacina constituída por cepa forte (GUMBOR – VET Forte, BIOVET, SP).

3.5.2 Extração do RNA

3.5.2.1 Método Trizol

As 68 bolsas do grupo caso e as 60 do grupo controle foram maceradas em PBS pH 7,2 (ANEXO 8.1.1) com graal e pistilo e acondicionadas em frascos de vidro. Destes frascos foram retirados 150 µl de cada macerado de bolsa e transferidos para microtubos tipo *Eppendorfs*. O restante do material foi armazenado em freezer -20°C.

Aos 150 µl de cada amostra foi adicionado 850 µl de Trizol LS (Invitrogen EUA). A seguir o material foi homogeneizado rapidamente, ficando em repouso na temperatura ambiente por cinco minutos. Em seguida foi adicionado a cada *Eppendorf*, 300 µl de clorofórmio. As amostras foram homogeneizadas rapidamente e ficaram em repouso por 15 minutos em temperatura ambiente. Essa operação foi repetida mais 42 uma vez até que se separassem duas fases. As amostras foram então centrifugadas por quinze minutos a 12.000 rpm a 4°C. A fase superior foi transferida para outro microtubo e foi adicionado 500 µl de isopropanol. As amostras foram homogeneizadas e incubadas por 10 minutos em temperatura ambiente. Após este tempo, foram centrifugadas a 12000rpm a 4C por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento, lavado com etanol. As amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm a 4°C por dois minutos. Essa operação foi repetida duas vezes e na última vez foi obtido o sedimento em cada *Eppendorf*. Com a tampa aberta, os microtubos foram colocados em estufa a 37°C para secagem, e então foi adicionado 20 µl de água DEPC para ressuspender o sedimento. O material foi armazenado em freezer a -20°C até o momento da execução da RT-PCR. Os controles positivos passaram pelo processo de extração juntos com as amostras.

3.5.3 Primers

Para amplificação do material foram usados dois pares de oligonucleotídeos iniciadores, os dois amplificavam regiões parciais dos genes que codificam regiões diferentes da proteína VP2 do vírus da DIB. Os iniciadores LVC 108 e 109, descrito por SELLERS et al. (1999) amplificam um fragmento de 847 pb do gene que codifica a proteína VP2 (região variável). Os iniciadores LVC 128 e 129 amplificam um segmento de 413 pb do gene que codifica a proteína VP2 (QUADRO 1).

QUADRO 1. Descrição dos *primers* utilizados na RT-PCR para detecção do vírus da Doença Infecciosa da Bolsa de Fabrício

Primers	Sequência 5'-3'	Sentido
---------	-----------------	---------

LVC108	CAACAGCCAACATCAACGAC	+
LVC109	CACCTCCATGAAGTACTCAC	-
LVC 128	TCATTGATGGTTAGTAGAGA	+

43

LVC 129	TTTATGGTGCCGTTTAGTGC	-
---------	----------------------	---

3.5.4 RT-PCR

As reações de transcrição reversa e amplificação do RNA viral foram realizadas em termociclador (PX2 THERMAL CYCLER). Para cada par de *primer* foi utilizado um programa (QUADRO 2).

QUADRO 2. Programas de RT-PCR para Detecção do Vírus da Doença infecciosa da Bolsa de Fabrício de acordo com o par de *primers* utilizados.

Etapas	Par de primers	
	LVC 108 e 109	LVC 128 e 129
Fase RT	45 ⁰ C/50'	45 ⁰ C/50'
Fase inicial	94 ⁰ C/5'	94 ⁰ C/5'
Desnaturação	94 ⁰ C/2'	94 ⁰ C/15''
Pareamento	40 ⁰ C/1'	45 ⁰ C/30''
Extensão	72 ⁰ C/1'	72 ⁰ C/1'

Número de ciclos	Desnaturação, Pareamento e Extensão 30 Ciclos	Desnaturação, Pareamento e Extensão 35 Ciclos
Extensão Final	72 ^o C/7'	72 ^o C/10'
Resfriamento	4 ^o C/5'	4 ^o C/5'

Foi utilizado um kit comercial da Promega (Access Quick[™] RT-PCR System), composto pelos seguintes componentes: Access Quick[™] Master Mix 2X, Nuclease-Free Water e a enzima AMVr (reverse transcriptase). Para cada amplificação usamos: 15 µl de água; 25 µl Access Quick; 2 µl do *Primer 1*; 2 µl do *Primer 2*; 5 µl amostra e 1 µl de AMVr. Todas as amostras foram testadas para os dois pares de *primers*, assim como os dois controles positivos, e em todas as baterias de amplificação realizadas usamos controles negativos para testar os componentes utilizados.

44

3.5.5 Eletroforese em gel de Agarose

Para leitura da amplificação foi realizada a eletroforese em gel de agarose a 1,5% (ANEXO 8.1.2) em fonte eletroforética (LOCCUS Biotecnology) A cada 10 µl de produto amplificado foram adicionados 3 µl de tampão de arrasto (ANEXO 8.1.3), colocados em seguida nos *slots* do gel de agarose submerso em tampão Tris Borato EDTA (TBE) 5X (ANEXO 8.1.4) e submetidos a eletroforese (84V). Após a corrida eletroforética, o gel foi corado em brometo de etídio (5mg/ml) (ANEXO 8.1.5) e a visualização dos *amplicons* foi feita sobre luz ultravioleta em transiluminador (EB-20E-Ultra-Lum, Inc.Carson, Califórnia).

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A relação entre diâmetro da bolsa de Fabrício, e os resultados positivos e negativos na RT-PCR para vírus da DIB foram analisados pelo teste de Qui-quadrado

Kruskall-Wallis. A relação entre os resultados positivos e negativos na RT-PCR para o VÍRUS da DIB e os escores de lesão histológica também foram analisados pelo teste de Qui-quadrado Kruskal-Wallis., assim como a relação entre a presença de celulite (grupo caso) ou ausência (grupo controle) e os escores de lesão histológica da bolsa de Fabrício. A análise entre os resultados positivos e negativos na RT-PCR para vírus da DIB e a presença (grupo caso) ou ausência (grupo controle) de celulite foram analisados pelo Qui-quadrado Exato de Fischer (THRUSFIELD, 1995).

4 RESULTADOS

4.1 CELULITE

4.1.1 Exame macroscópico

Macroscopicamente as lesões cutâneas localizavam-se na coxa, dorso e área cloacal, caracterizada por um aumento na espessura da pele e coloração amarelo-avermelhada (Figura 2). Ao corte observava-se no subcutâneo, edema, exsudato e a presença de placas amareladas às vezes destacáveis (Figura 3).

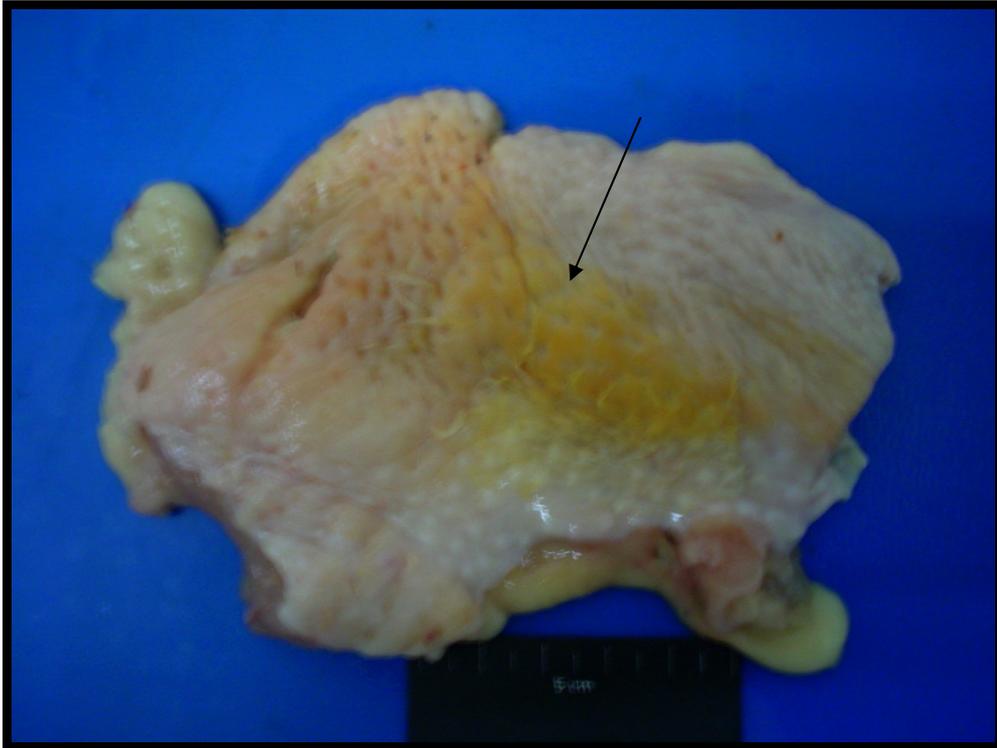


Figura 2. Frango. Celulite. Pele espessada de coloração amarelada (seta)

46

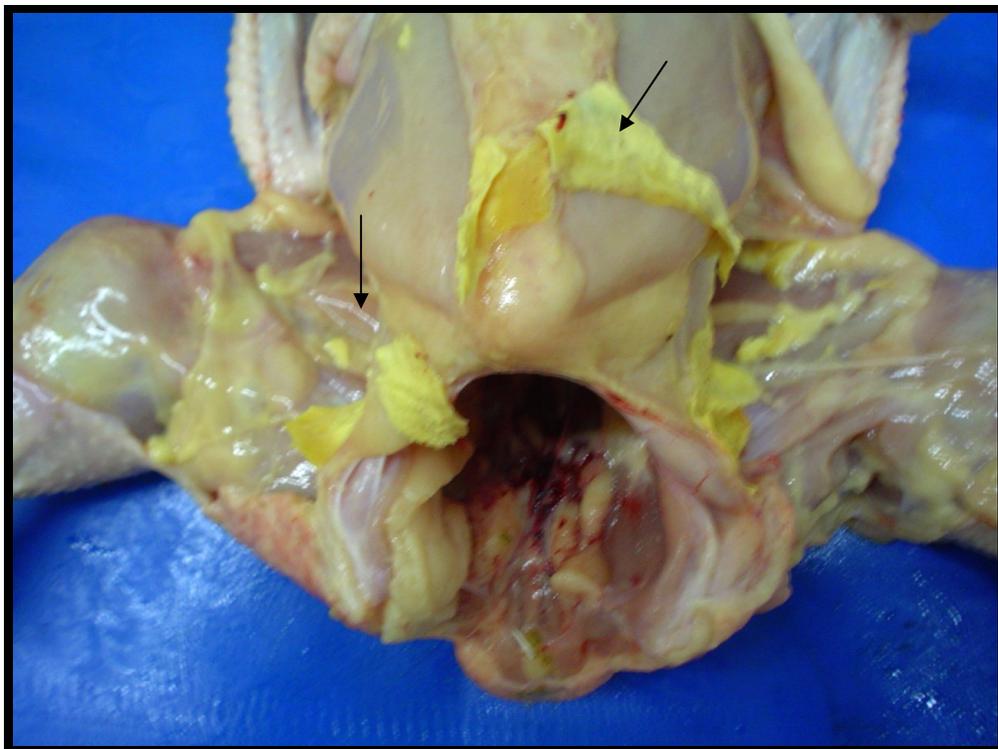


Figura 3. Frango. Celulite. Inúmeras placas fibrinopurulentas (setas).

4.1.2 Exame histopatológico

Microscopicamente as lesões foram constituídas, por placas fibrinosas ricas em detritos celulares envoltas por uma barreira de macrófagos e células gigantes multinucleadas (Figura 4). Na periferia era freqüente o infiltrado difuso misto de mononucleares e heterófilos, tecido de granulação, edema e restos celulares (Figura 5). Era comum a infiltração também da musculatura regional (Figura 6).

47

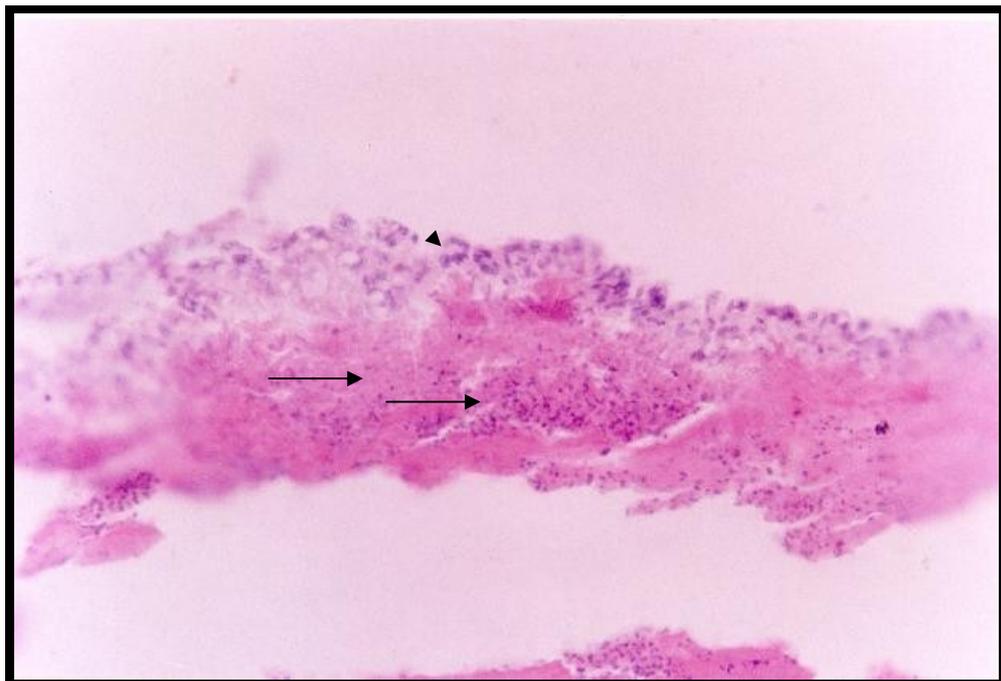


Figura 4. Frango. Celulite. Placa de característica fibrinosa rica em restos celulares (seta), envolta por macrófagos e células gigantes multinucleadas (cabeça de seta). H.E. obj. 20X

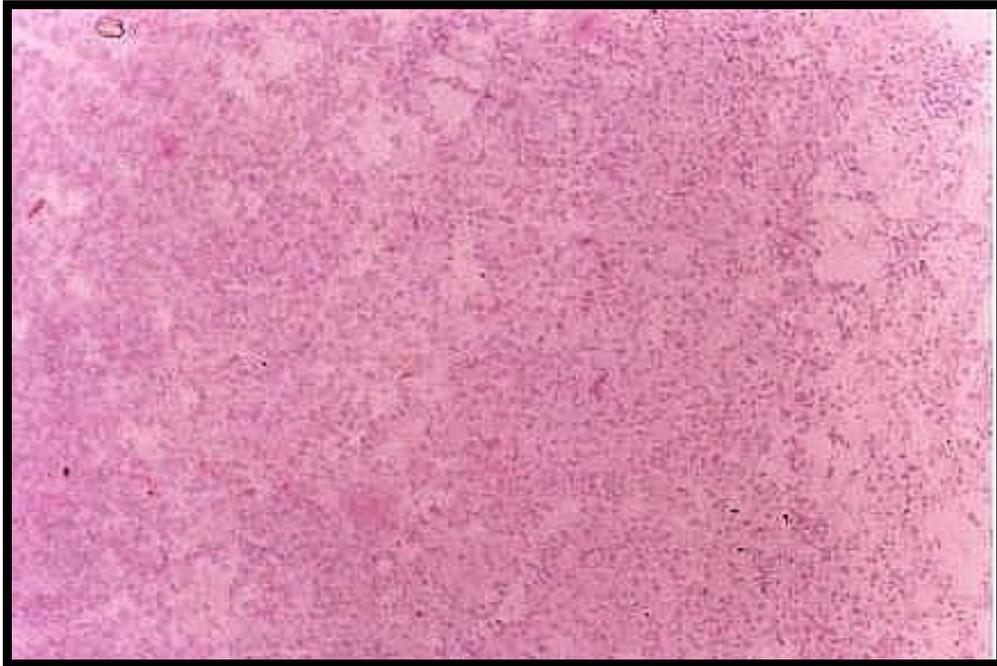


Figura 5. Frango. Celulite. Edema e restos celulares no tecido subcutâneo H.E obj 10X

48

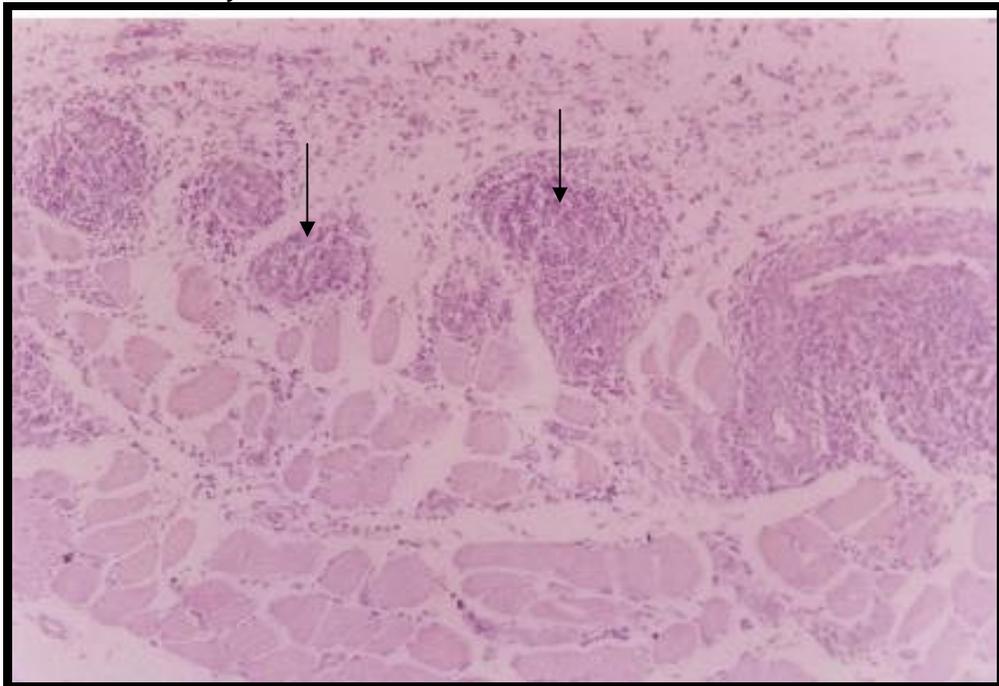


Figura 6. Frango. Celulite. Múltiplos nódulos (seta) de constituição mononuclear na musculatura regional

4.2 BAÇO

4.2.1 Exame Histopatológico

Na análise histopatológica do baço obtivemos nos dois grupos, caso e controle, lesões semelhantes como depleção linfóide associada com hiperplasia de células reticulares (Figura 7).

49

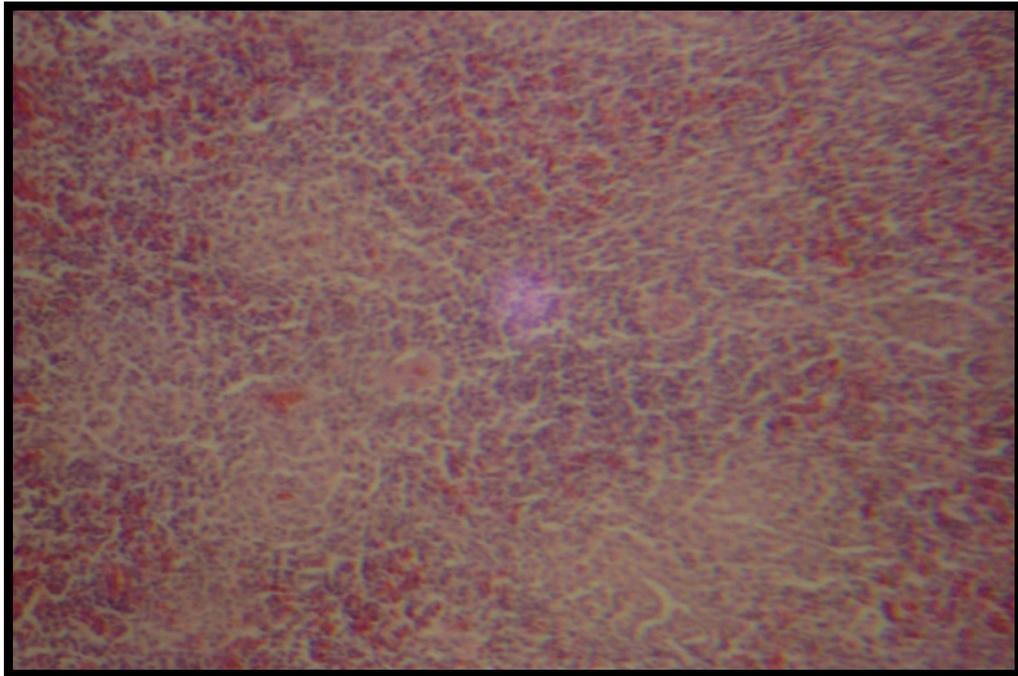


Figura 7. Frango. Baço. Depleção linfóide e hiperplasia de células reticulares H.E. obj. 10X

4.2.2 PCR

Todas as amostras de baço, dos grupos caso e controle, obtiveram resultados positivos à PCR para o vírus da Anemia Infecciosa das Galinhas, de acordo com os resultados fornecidos pelo Laboratório de Doença das Aves da Universidade Federal de Minas Gerais.

4.3 BOLSA DE FABRÍCIO

4.3.1 Exame macroscópico e Mensuração da bolsa de Fabrício

As bolsas não apresentaram nenhuma alteração significativa em seu exame macroscópico tanto no grupo caso quanto no controle (Figura 8).

As bolsas de Fabrício apresentaram os seguintes resultados na mensuração na escala do bursômetro, convertida em milímetros a) grupo caso - 28 frangos com bolsas de diâmetro 10 mm (tamanho 3); 37, com diâmetro 13 mm (tamanho 4) (Figura 6); três, com diâmetro 16 mm (tamanho 5); b) grupo controle – 26 frangos com bolsas de diâmetro 10 mm (tamanho 3); 31, com diâmetro 13 mm (tamanho 4); três de diâmetro 16 mm (tamanho 5).

50

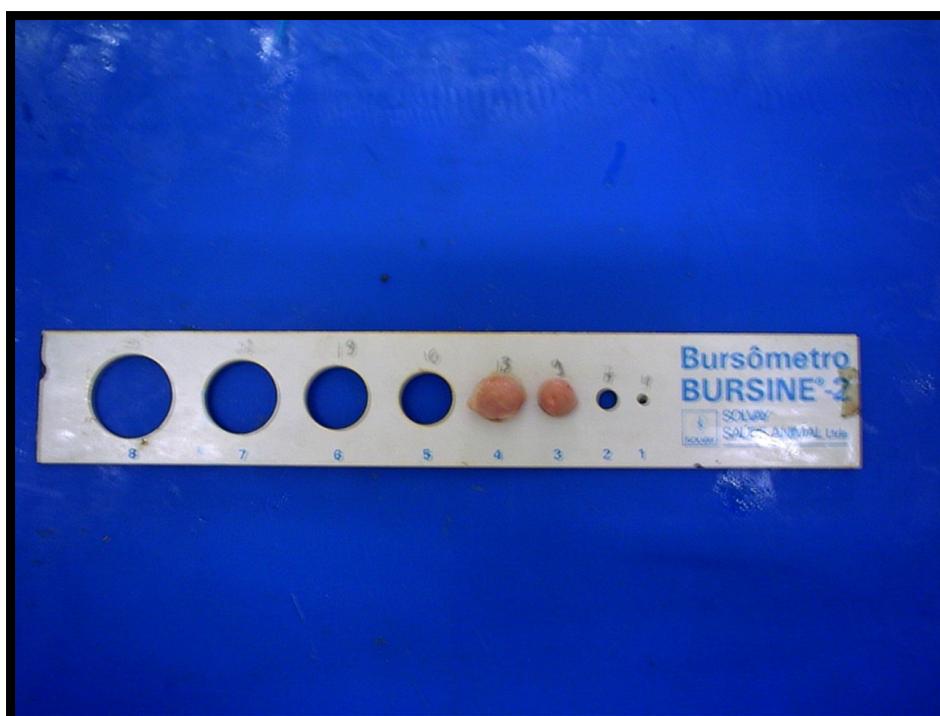


Figura 8. Bursômetro com bolsas de tamanhos 3 e 4.

4.3.2 Exame histopatológico

No grupo caso o exame microscópico apresentou uma ave com escore 0, isto é a arquitetura do órgão estava normal (Figura 9). Nos dois grupos ocorreram casos de necrose dos elementos linfóides de múltiplos folículos, escore 2 (Figura 10). Em relação ao escore 3 os dois grupos apresentaram no exame microscópico da bolsa, múltiplas alterações de folículos e interstício freqüentemente acompanhadas de cistos no epitélio de revestimento das pregas. As lesões foliculares apresentavam as seguintes

características: material fluido fortemente acidófilo entre os elementos linfóides da medular; infiltrado de heterófilos, ora na cortical , ora em todo o folículo, ora no interstício (Figura 11); necrose afetando de poucos a inúmeros folículos; rarefação discreta a intensa dos elementos linfóides; atrofia dos folículos, por vezes com desaparecimento dos elementos linfóides; cistos de diâmetros variados na medular e justacortical, preenchidos, às vezes, com fluido acidófilo (Figuras 12) . As lesões do interstício eram representadas por fibrose, bem como por infiltração inflamatória de mononucleares e edema (Figura 13 e 14). As alterações de caráter individual referente a cada grupo (caso e controle) constam dos quadros 3 e 4.

51

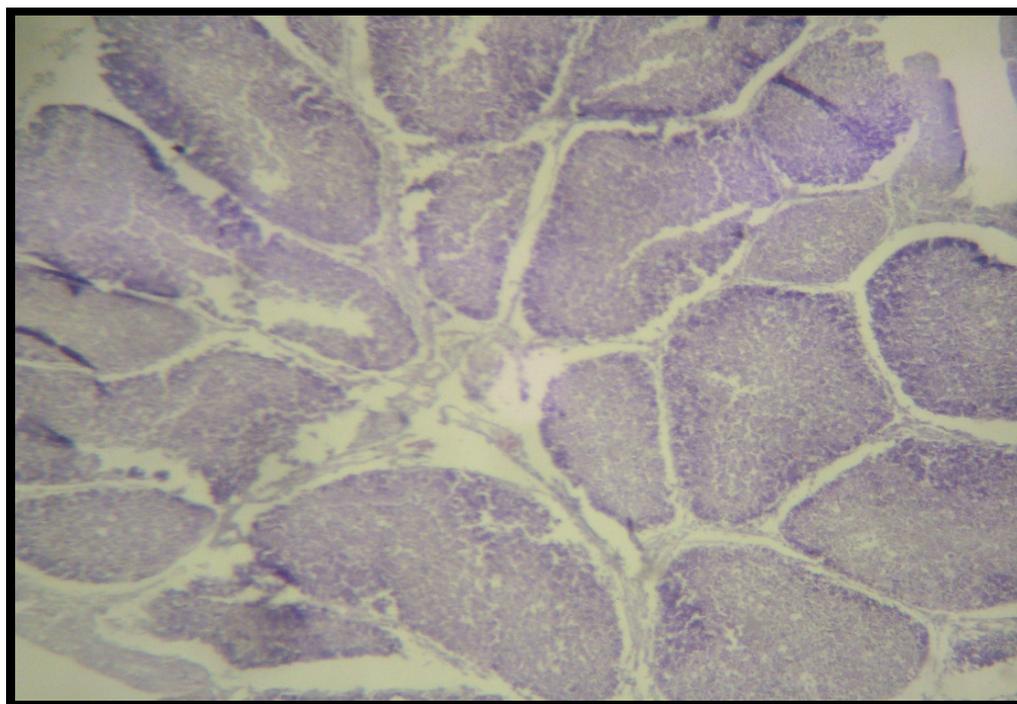


Figura 9. Frango. Bolsa de Fabrício. Arquitetura normal do órgão. H.E 10X (Escore 0)

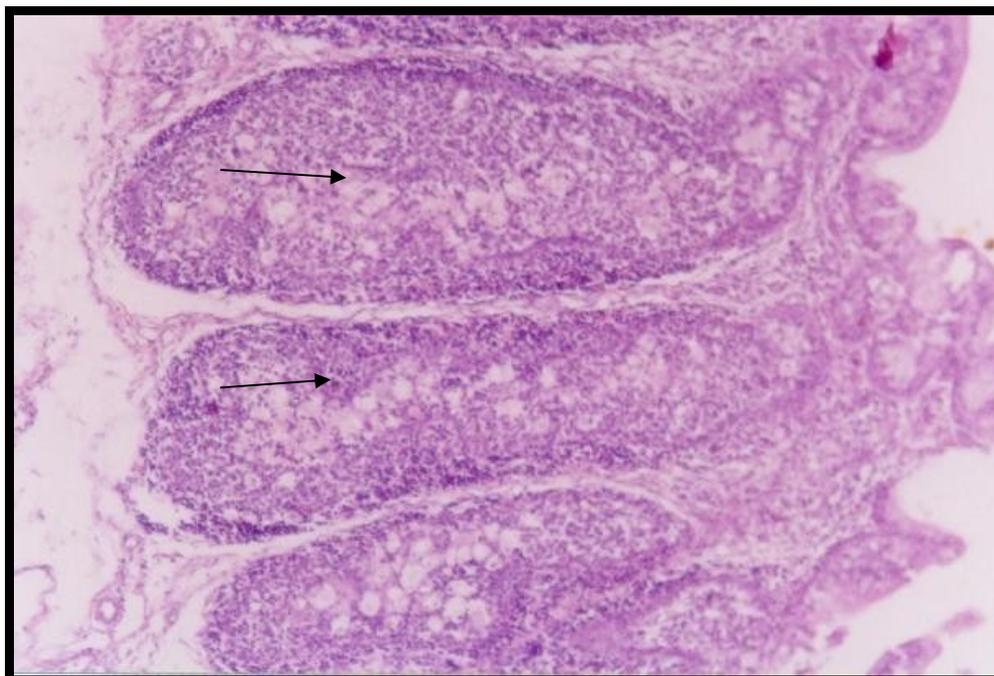


Figura 10. Frango. Bolsa de Fabrício. Necrose dos elementos linfóides de múltiplos folículos (seta) (Escore 2) H.E 10X

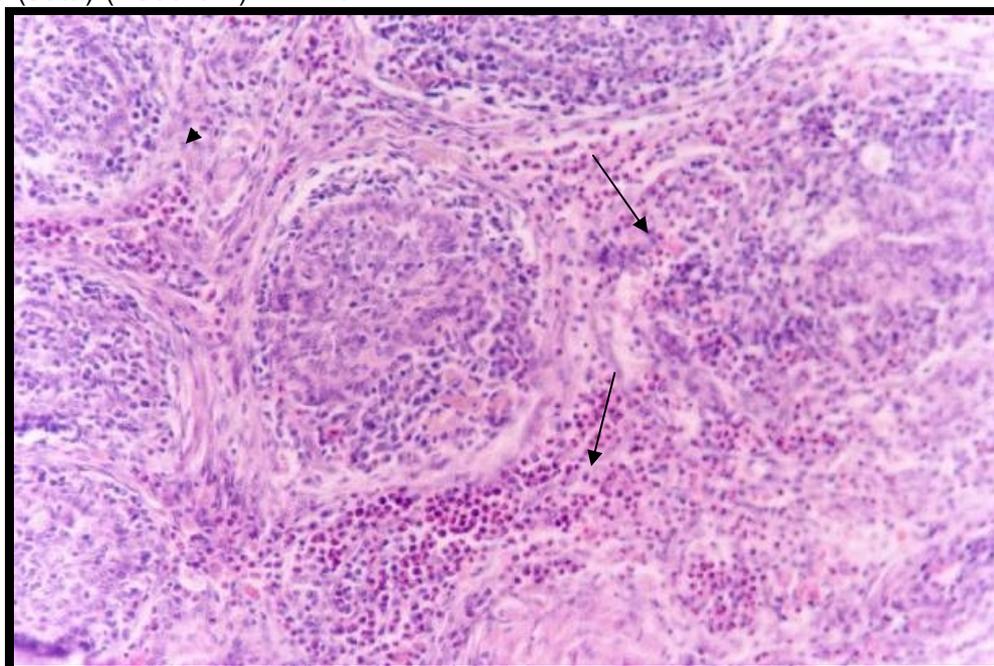


Figura 11. Frango. Bolsa de Fabrício. Infiltrado de heterófilo no interstício (seta) espessado por fibrose (cabeça de seta). Perda da arquitetura do órgão. (Escore 3).H.E. obj. 10X

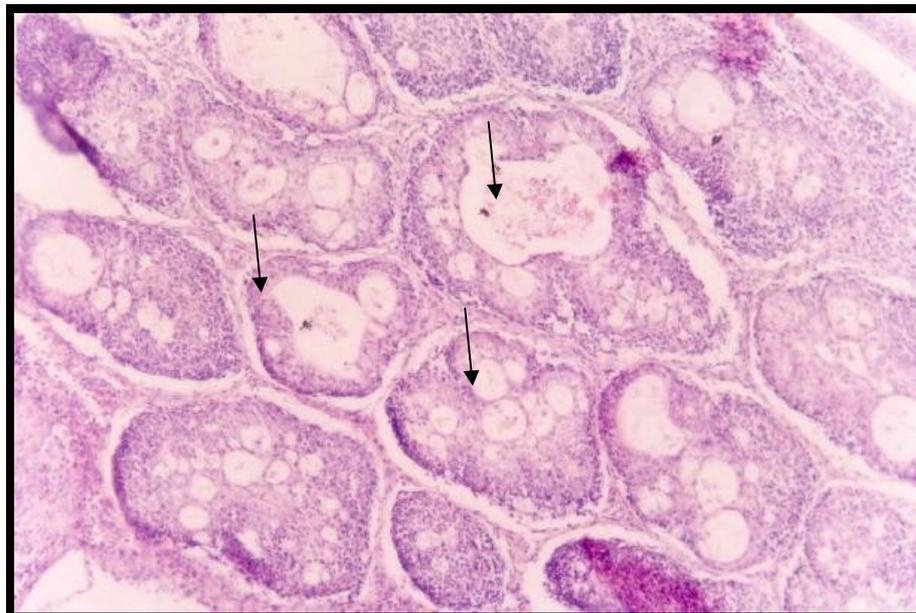


Figura 12. Frango. Bolsa de Fabrício. Presença de múltiplos cistos, de variados diâmetros; intrafoliculares (seta) (Escore 3) H.E obj 10X

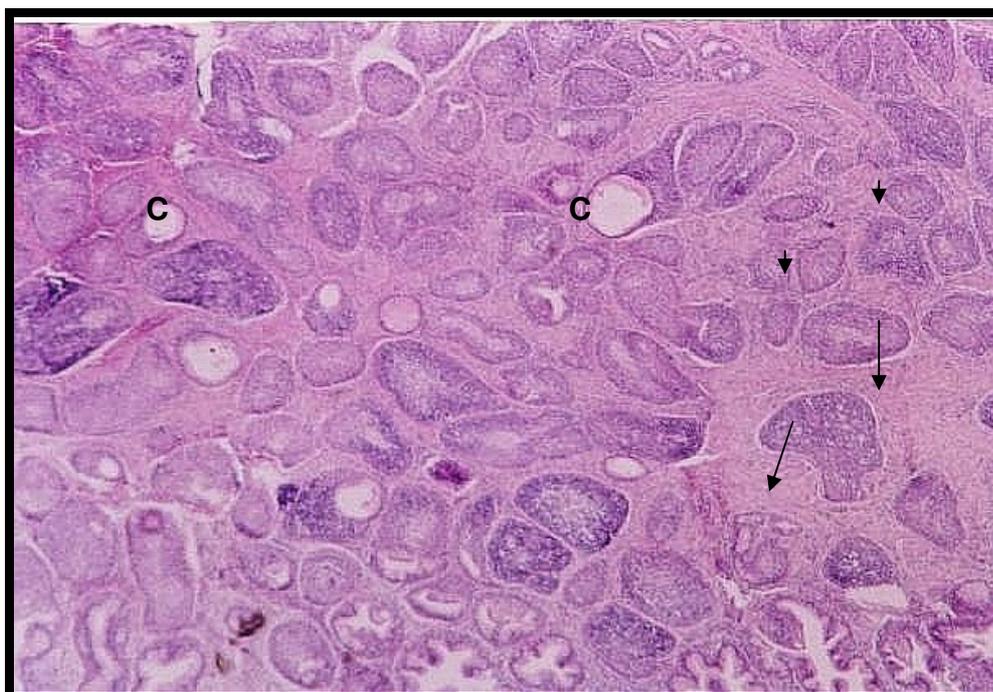


Figura 13 Frango. Bolsa de Fabrício. Aspecto cirrótico do órgão. Nota-se acentuada fibrose (seta), atrofia de folículos (cabeça de seta) e múltiplos cistos foliculares (C) (Escore 3). H.E. obj. 4X

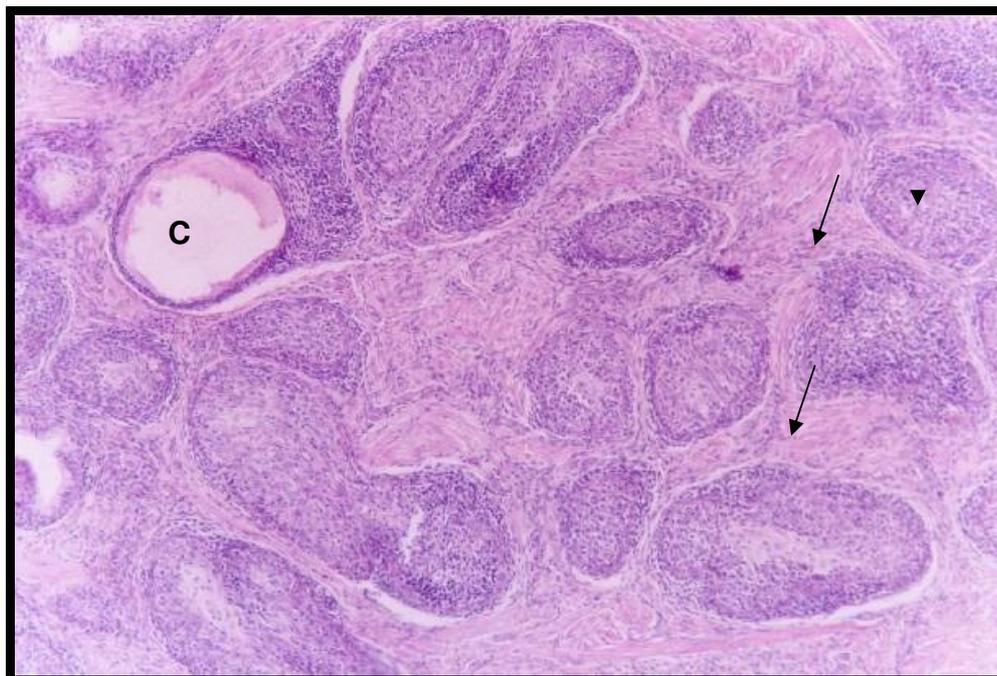


Figura 14. Frango. Bolsa de Fabrício..Aspecto cirrótico do órgão. Nota-se acentuada fibrose (seta), atrofia de folículos (cabeça de seta) e múltiplos cistos foliculares (C) (Escore 3) H.E obj 10X

QUADRO 3. Análise histopatológica da bolsa de Fabrício de frangos de corte ao abate portadores de celulite

AVES	LESÕES
1	CISTOS, FIBROSE
2	DISCRETA FIBROSE COM INFILTRADO MONONUCLEAR, CISTOS EPITELIAIS
3	CISTOS FOLICULARES E EPITELIAIS
4	FIBROSE, ATROFIA FOLICULAR, CISTOS
5	FIBROSE, ATROFIA
6	NECROSE, INFILTRADO MONONUCLEAR
7	CISTOS FOLICULARES, NECROSE
8	TRANSFORMAÇÃO CÍSTICA DE FOLÍCULOS, PRESENÇA DE GRANULÓCITOS
9	DISCRETA FIBROSE, ATROFIA DE FOLÍCULOS
10	CISTOS, FIBROSE, INFILTRADO POR GRANULÓCITO
11	FIBROSE, NECROSE FOLICULAR, RAROS CISTOS
12	DISCRETA FIBROSE, ATROFIA, CISTOS, GRANULÓCITOS
13	ATROFIA, RAREFAÇÃO LINFOIDE, CISTOS
14	FIBROSE, CISTOS, ATROFIA DE FOLÍCULOS, INFILTRADO POR MONONUCLEARES
15	CISTOS, FIBROSE, INFILTRAÇÃO POR MONONUCLEARES
16	FIBROSE, CISTOS
17	FIBROSE, ATROFIA, ACENTUADA RAREFAÇÃO LINFOÍDE
18	RAREFAÇÃO LINFOÍDE, EDEMA, ATROFIA DISCRETA
19	CISTOS MÚLTIPLOS
20	CISTOS, FIBROSE, INFILTRAÇÃO POR MONONUCLEARES
21	CISTOS, FIBROSE, INFILTRADO POR GRANULÓCITO
22	FIBROSE, ATROFIA, CISTOS
23	ATROFIA, FIBROSE, INFILTRADO DE MONONUCLEARES, CISTOS

24	RAROS CISTOS, DISCRETO INFILTRADO DE GRANULÓCITOS
25	FIBROSE, ATROFIA, CISTOS FOLICULARES
26	CISTOS, FIBROSE, ATROFIA
27	INTENSA NECROSE FOLICULAR, CISTOS EPITELIAIS, ATROFIA SEVERA
28	EDEMA, INFILTRAÇÃO DE GRANULÓCITOS
29	CISTOS, INFILTRAÇÃO POR MONONUCLEARES
30	FIBROSE COM RAREFAÇÃO LINFOÍDE
31	HIPERPLASIA
32	DISCRETA ATROFIA FOLICULAR
33	CISTOS, DISCRETA FIBROSE COM INFILTRAÇÃO POR MONONUCLEARES
34	FIBROSE, CISTOS, INFILTRADO DE GRANULÓCITOS
35	CISTOS, ATROFIA FOLICULAR, INFILTRADO DE GRANULÓCITOS
36	FIBROSE INTENSA, RAREFAÇÃO LINFOÍDE
37	HIPERPLASIA
38	NECROSE, FIBROSE, INFILTRADO MONONUCLEAR
39	NECROSE, INTENSA RAREFAÇÃO LINFOÍDE
40	EDEMA, CISTOS
41	CISTOS, FIBROSE
42	DISCRETA ATROFIA FOLICULAR
43	DISCRETA FIBROSE, EDEMA, GRANULÓCITOS EM FOLÍCULOS
44	FIBROSE COM INFILTRADO MONONUCLEAR INTERSTICIAL, CISTOS
45	EDEMA, INFILTRADO DE GRANULÓCITOS
46	FIBROSE, CISTOS
47	FIBROSE, INFILTRADO MONONUCLEAR
48	ATROFIA, FIBROSE, INFILTRADO DE MONONUCLEARES E RAREFAÇÃO LINFOÍDE
49	INTENSA RAREFAÇÃO LINFOÍDE, NECROSE
50	CISTOS, FIBROSE, EDEMA, GRANULÓCITOS
51	CISTOS, FIBROSE (continua)
52	CISTOS, FIBROSE.....(continuação)
53	NECROSE
54	FIBROSE, INFILTRADO MONONUCLEAR, CISTOS, RAREFAÇÃO LINFOÍDE
55	CISTOS, FIBROSE
56	RAREFAÇÃO LINFOÍDE SEVERA
57	EDEMA, GRANULÓCITOS, CISTOS
58	FIBROSE
59	CISTOS, DISCRETA FIBROSE
60	FIBROSE, INFILTRAÇÃO POR MONONUCLEARES, CISTOS FOLICULARES
61	CISTOS, FIBROSE, ATROFIA DOS FOLÍCULOS, INFILTRADO POR MONONUCLEARES
62	ATROFIA DE FOLÍCULOS, FIBROSE
63	CISTOS, FIBROSE, INFILTRADO DE MONONUCLEARES, EDEMA
64	FIBROSE COM ATROFIA
65	NECROSE, ATROFIA DISCRETA, INFILTRADO MONONUCLEAR
66	CISTOS, FIBROSE
67	FIBROSE, ATROFIA
68	FIBROSE, INFILTRADO MONONUCLEAR

QUADRO 4. Análise histopatológica da bolsa de Fabrício de frangos de corte ao abate sem celulite

AVES	LESÕES
------	--------

1	RAREFAÇÃO LINFOÍDE, DISCRETA ATROFIA
2	RAREFAÇÃO, FIBROSE, ATROFIA
3	EDEMA, RAREFAÇÃO LINFOÍDE SEVERA
4	DISCRETA FIBROSE, INFILTRADO DE GRANULÓCITOS, EDEMA
5	CISTOS, ACENTUADA INFILTRAÇÃO DE HETERÓFILOS
6	ASPECTO NORMAL
7	EDEMA, DISCRETA ATROFIA FOLICULAR
8	CISTOS, FIBROSE
9	CISTOS EPITELIAIS, FIBROSE, EDEMA, INFILTRADO DE HETERÓFILOS
10	FIBROSE, ATROFIA, RAREFAÇÃO LINFOÍDE
11	EDEMA, RAREFAÇÃO LINFOIDE SEVERA
12	RAREFAÇÃO LINFOÍDE, DISCRETA FIBROSE
13	RAREFAÇÃO LINFOÍDE COM EDEMA, DISCRETA ATROFIA FOLICULAR
14	CISTOS , FIBROSE
15	DISCRETA FIBROSE, RAREFAÇÃO LINFOIDE, ATROFIA
16	ATROFIA FOLICULAR DISCRETA
17	CISTOS, FLUÍDO FOLICULAR, RAREFAÇÃO LINFOÍDE
18	EDEMA, NECROSE, ATROFIA, CISTOS EPITELIAIS
19	EDEMA, RAREFAÇÃO LINFOÍDE, DISCRETA ATROFIA
20	FIBROSE, INFILTRADO MONONUCLEAR
21	FIBROSE, CISTO, INFILTRADO DE GRANULÓCITOS
22	CISTOS, FIBROSE, INFILTRADO POR MONONUCLEARES
23	INFILTRADO PERIFOLICULAR POR GRANULOCITOS
24	EDEMA, CISTOS
25	CISTOS, RAREFAÇÃO LINFOÍDE, FLÍDO FOLICULAR
26	FIBROSE, EDEMA, INTENSA VARIAÇÃO DO DIÂMETRO DOS FOLÍCULOS
27	FIBROSE COM ATROFIA
28	DISCRETA FIBROSE, RAREFAÇÃO LINFOIDE
29	FIBROSE, ATROFIA, NECROSE
30	CISTO, RAREFAÇÃO LINFOÍDE
31	ATROFIA FOLICULAR, SUBSTÂNCIA INTRAFOLICULAR ACIDÓFILA
32	FOLÍCULO HIPERPLÁSICO, NECROSE, ATROFIA DE ALGUNS FOLÍCULOS, CISTOS, FIBROSE
33	RAREFAÇÃO LINFOÍDE, NECROSE DE FOLÍCULOS, FIBROSE, EDEMA, CISTOS
34	ATROFIA, COM ACENTUADA FIBROSE (continua)
35	NECROSE FOLICULAR, RAREFAÇÃO DE ELEMENTOS LINFOIDES, EDEMA.....(continuação)
36	RAREFAÇÃO LINFOÍDE, EDEMA, DISCRETA FIBROSE, ATROFIA
37	RAREFAÇÃO LINFOÍDE, ATROFIA DISCRETA
38	NECROSE, RAREFAÇÃO LINFOÍDE, FIBROSE, ATROFIA, CISTOS
39	ACENTUADA ATROFIA FOLICULAR, NECROSE, FIBROSE
40	ACENTUADA RAREFAÇÃO DE ELEMENTOS LINFOIDES
41	CISTO, FIBROSE
42	POUCOS FOLÍCULOS ATROFIADOS
43	DISCRETA FIBROSE, INFILTRAÇÃO DE MONONUCLEARES, RAREFAÇÃO LINFOÍDE
44	CISTOS EPITELIAIS DE REVESTIMENTO, NECROSE, FIBROSE
45	CISTOS MÚLTIPLOS, ATROFIA DE FOLÍCULOS, EDEMA, NECROSE
46	FIBROSE, ATROFIA DE FOLÍCULOS, CISTOS
47	EDEMA, DISCRETA FIBROSE, CISTOS
48	ATROFIA, FIBROSE, INFILTRADO MONONUCLEAR
49	DISCRETO INFILTRADO MONONUCLEAR, FIBROSE, EDEMA
50	HIPERPLASIA DE FOLÍCULOS, FIBROSE
51	ATROFIA, FIBROSE, INFILTRADO MONONUCLEAR, NECROSE
52	FIBROSE, RAREFAÇÃO LINFOÍDE, INFILTRADO MONONUCLEAR

53	HIPERPLASIA FOLICULAR, FLUÍDO FOLICULAR
54	ACENTUADA ATROFIA, FIBROSE
55	CISTOS, DISCRETA FIBROSE, INFILTRADO MONONUCLEAR
56	EDEMA, FIBROSE, INFILTRADO MONONUCLEAR
57	CISTOS, FIBROSE, INFILTRADO MONONUCLEAR, NECROSE
58	CISTO, FIBROSE
59	NECROSE, FIBROSE, INFILTRADO MONONUCLEAR
60	ATROFIA FOLICULAR DISCRETA

As bolsas de Fabrício apresentaram os seguintes escores de gravidade das lesões à microscopia: a) grupo caso - nenhum frango apresentou escore 0; dois, com escore 1; 11, com escore 2; 55, com escore 3; b) grupo controle – um frango recom escore 0; um, com escore 1; 14, com escore 2; 44, com escore 3 (Tabela 1).

Tabela 1. Escore de lesões na bolsa de Fabrício em frangos de corte portadores de celulite (caso) e sem a enfermidade (controle).

GRUPOS	ESCORE DE LESÕES NA BOLSA DE FABRÍCIO (%)				TOTAL
	0	1	2	3	
CASO	0 (0/128)	1,56 (2/128)	8,59 (11/128)	42,96 (55/128)	53,125 (68/128)
CONTROLE	0,78 (1/128)	0,78 (1/128)	10,93 (14/128)	34,37 (44/128)	46,875 (60/128)
TOTAL	0,78 (1/128)	2,34 (3/128)	19,53 (25/128)	77,34 (99/128)	100 (128/128)

Kruskal- Wallis , $p \leq 0,05$

Houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre os grupos caso e controle em relação à gravidade da lesões de bolsa de Fabrício obtidas, sendo o escore 3 o mais mais grave, presente em maior proporção nas aves do grupo caso. A celulite foi influenciada pela gravidade das lesões.

4.3.3 RT-PCR

O grupo caso apresentou 22 amostras positivas para o VDIB, e o grupo controle nove amostras positivas. Sendo que no grupo caso das 22 amostras, nove foram

positivas utilizando o par de *primers* 108 e 109 (Figura 15); e 13 foram positivas utilizando o par de *primers* 128 e 129 (Figuras 16, 17 e 18). No grupo controle nove amostras positivas foram detectadas utilizando os *primers* 128 e 129 (Figuras 19 e 20). As duas vacinas testadas também foram positivas para o VDIB (Figuras 15,16,17,18, 19 e 20).

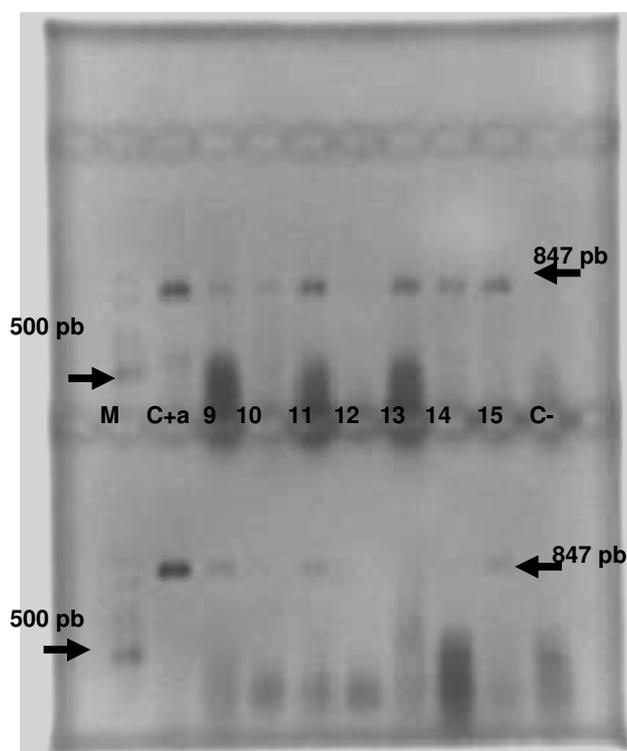


Figura 15. RT-PCR para detecção do vírus da Doença Infecciosa da Bolsa de Fabrício em frangos de corte portadores de celulite - **GRUPO CASO**. *Primers* utilizados **LVC 108 e 109**. **M**. LADDER, 100pb; **C+**. Vacina GUMBOR-VET, cepa intermediária; **C+a**. Vacina GUMBOR-VET, cepa forte **Amostras positivas: 1, 2, 3, 5, 6, 7, 9, 11, 15**. **Amostras negativas: 4, 8, 10, 12, 13, 14 e C-** (água).

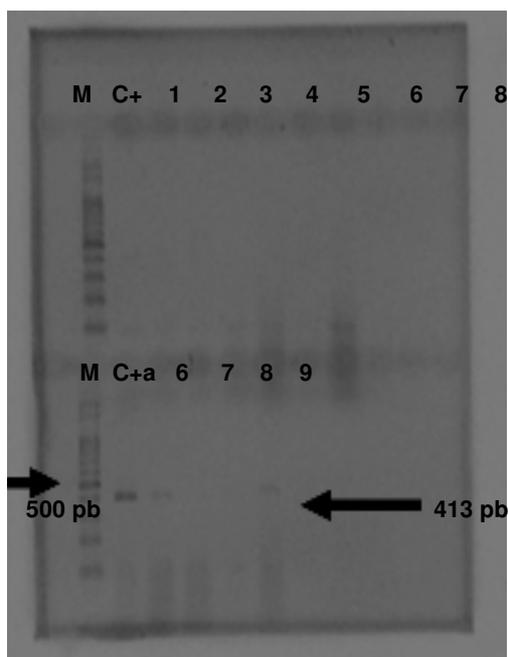


Figura 16. RT-PCR para detecção do vírus da DIB em bolsas de Fabrício de frangos de corte portadores de celulite - **GRUPO CASO**. *Primers* utilizados **LVC 128 e 129**. LADDER, 100pb; **C+**. Vacina GUMBOR-VET cepa intermediária; **Ca+** Vacina GUMBOR-VE cepa forte; **Amostras positivas: 3, 4, 7, 9. Amostras negativas: 1, 2, 5, 6, 8, C- (água).**

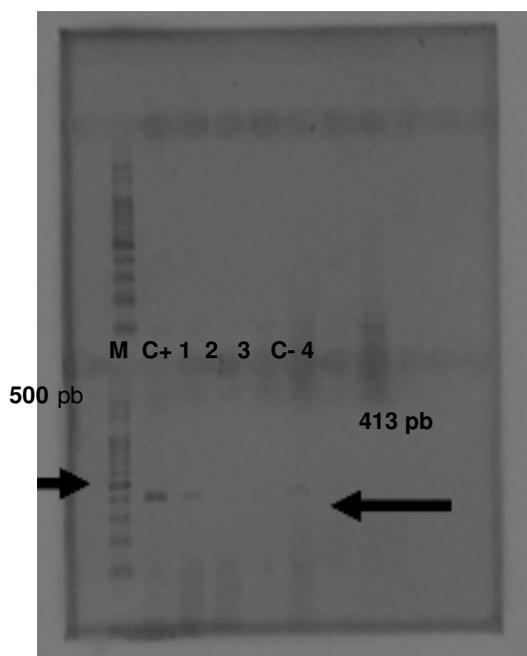


Figura 17. RT-PCR para detecção do vírus da DIB em bolsas de Fabrício de frangos de corte portadores de celulite - **GRUPO CASO**. *Primers* utilizados **LVC 128 e 129**. **M**. LADDER, 100pb; **C+**. Vacina GUMBOR-VET, cepa intermediária; **Amostras positivas: 1, 4. Amostras negativas: 2, 3, C- (água).**

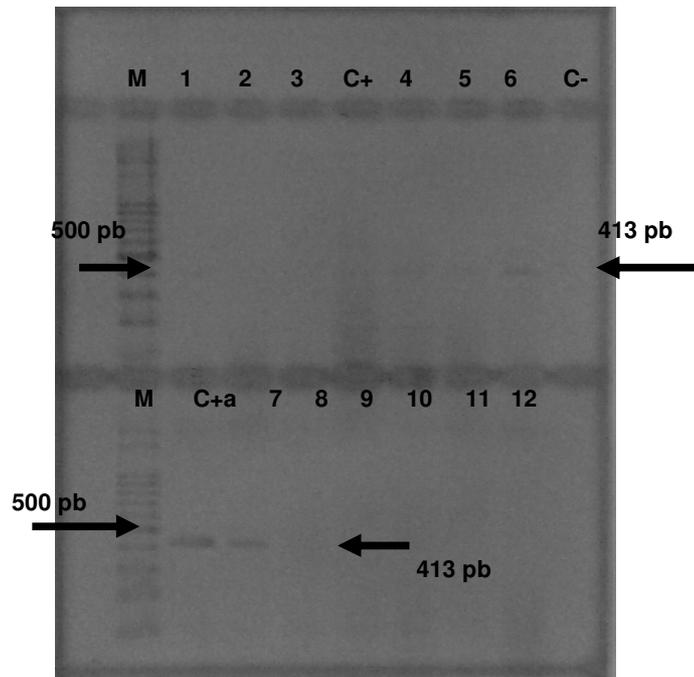


Figura 18. RT-PCR para detecção do vírus da DIB em bolsas de Fabrício de frangos de corte portadores de celulite - **GRUPO CASO**. *Primers* utilizados **LVC 128 e 129**. **M**. LADDER, 100pb; **C+**. Vacina GUMBOR-VET cepa intermediária; **C+a**. Vacina GUMBOR-VET cepa forte. **Amostras positivas: 4, 5, 6, 7**. **Amostras negativas: 1, 2, 3, 8, 9 10, 11, 12, C-** (água).

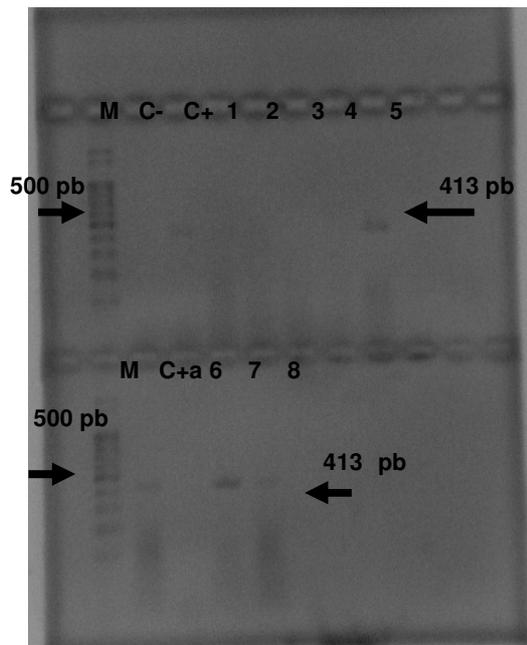


Figura 19. RT-PCR para detecção do vírus da DIB em bolsas de Fabrício de frangos de corte sem celulite - **GRUPO CONTROLE**. *Primers* utilizados **LVC 128 e 129**. **M**. LADDER, 100pb; **C+**. Vacina GUMBOR-VET cepa intermediária; **C+a**. Vacina GUMBOR-VET cepa forte; **Amostras positivas: 5, 7, 8**. **Amostras negativas: 1, 2, 3, 4, 6, C-** (água).

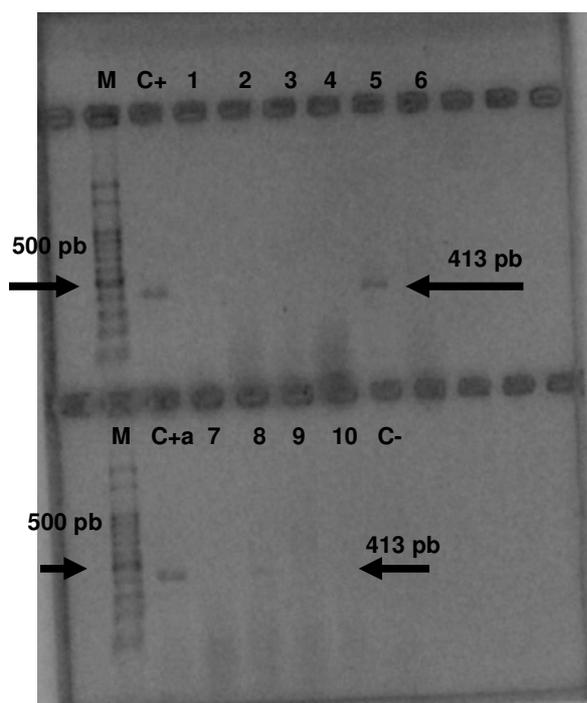


Figura 20. RT-PCR para detecção do vírus da DIB em bolsas de Fabrício de frangos de corte sem celulite - **GRUPO CONTROLE**. *Primers* utilizados **LVC 128 e 129**. **M**. LADDER, 100pb; **C+**. Vacina GUMBOR-VET, cepa intermediária; **C+a**. Vacina GUMBOR-VET cepa forte; **Amostras positivas: 1, 2, 3, 4**. **Amostras negativas: 6, 7, 8, 9, 10 e C-(água)**.

A relação entre a presença do VDIB e o tamanho da bolsa de Fabrício em frangos de corte ao abate não foi significativa, embora tenha sido observado que das 31 aves (grupos caso e controle) positivas na RT-PCR, 12 obtiveram tamanho de bolsa 3 (10mm) e 19 aves (grupos caso e controle) obtiveram tamanho de bolsa 4 (13mm); das 97 negativas (grupo caso e controle) na RT-PCR, 42 aves obtiveram tamanho de bolsa 3 (10mm) e 49 aves (grupo caso e controle) obtiveram tamanho de bolsa 4 (13mm) e seis obtiveram tamanho de bolsa 5 (16mm).

A relação entre a gravidade das lesões e a presença do vírus da DIB pela RT-PCR foi significativa (Qui-quadrado Kruskal- Wallis, $p \leq 0,05$). Nenhum frango apresentou escore 0 ou escore 1 e foi positivo na RT-PCR. Dos 97 frangos negativos, um apresentou escore 0; três obtiveram escore 1; 20 apresentaram escore 2 e 73 apresentaram escore 3. No entanto dos 31 frangos positivos, cinco apresentaram escore 2 e 26 frangos apresentaram escore 3. (Tabela 2).

Tabela 2. RT-PCR para o vírus da Doença Infecciosa da Bolsa de Fabrício e lesões histológicas na Bolsa de Fabrício em frangos de corte sob Inspeção Sanitária

RT-PCR	Escore de Lesão				Total
	0	1	2	3	
Positivo	0	0	5	26	31
Negativo	1	3	20	73	97
Total	1	3	25	99	128

Kruskal- Wallis , $p \leq 0,05$

Dos 31 frangos positivos na RT-PCR para o VDIB, 22 apresentavam celulite e nove não apresentaram a lesão e dos 97 negativos a maioria não tinha celulite (Qui-quadrado Exato de Fischer, $p= 0,0245$). Pela análise de Risco (Odds Ratio - OD), a presença do vírus DIB favoreceu em 2,710 vezes o aparecimento de celulite (Tabela 3).

Tabela 3. RT-PCR para o vírus da Doença Infecciosa da Bolsa de Fabrício (DIB) em frangos de corte portadores de celulite (caso) e sem (controle) a enfermidade

RT-PCR para o vírus da DIB	Celulite		Total
	Caso	Controle	
Positivo	22	9	31
Negativo	46	51	97
Total	68	60	128

Teste Exato de Fischer $p=0,0245$
 Odds ratio – OD = 2,710
 95% (1.133 a 6.483)

5 DISCUSSÃO

As análises macroscópicas de pele de frangos de corte no presente estudo foram muito semelhantes às descritas por Messier et al.(1993), Fallavena et al. (2000 a), Fallavena (2000b) e Andrade (2005). A macroscopia, dependendo do grau de desenvolvimento e dos achados das lesões de celulite, foi uma ferramenta importante no diagnóstico desta enfermidade. Na maioria dos casos foram encontradas placas fibrinosas no subcutâneo e quando estas lesões não estavam presentes o diagnóstico foi mais difícil, fato relatado também por Messier et al.(1993), Fallavena (2000b) e Silva e Mota (2003). Messier et al (1993) realizaram uma pesquisa onde estas lesões estavam geralmente localizadas na área cloacal, sendo estas bem definidas e caracterizadas. No presente estudo, além da área cloacal, as lesões foram encontradas na coxa e no dorso.

Os achados microscópicos também foram muito semelhantes aos descritos por outros autores (Peighambari et al., 1995; Fallavena, 2000; Silva e Mota 2003). Messier et al (1993) relataram granulomas no tecido subcutâneo caracterizados por infiltrado fibrino caseoso, conforme os achados deste trabalho, além da presença, em alguns casos, de ulceração focal na epiderme, este não encontrado neste estudo. Segundo a Instrução Normativa n° 210 de 10/11/1998 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, qualquer órgão ou parte da carcaça que estiver afetado por um processo inflamatório deverá ser condenado e, se existir evidência de caráter sistêmico do problema, a carcaça e as vísceras na sua totalidade deverão ser condenadas. Neste contexto, a celulite se encaixou como processo inflamatório e esses dados justificaram o desvio das aves do grupo caso para julgamento e destino, à inspeção.

Problemas de pele (dermatites, celulites), respiratórios, caquexia e outras infecções secundárias podem ser favorecidos por um quadro de imunossupressão como o causado pelo vírus da DIB (LUKERT; SAIF, 1991; ROSALES, 1999; FALLAVENA, 2001). Quando a bolsa de Fabrício é acometida pelo vírus da DIB são relacionadas alterações macroscópicas como edema e hiperemia, descritas por Bordin (2001) e que não foram encontradas em nosso estudo.

A mensuração das bolsas de Fabrício, pelo bursômetro, no presente estudo, mostrou elevado percentual para os menores tamanhos (95,31%) tanto nos grupos caso quanto no controle, representados por 54 (42,18%) bolsas de tamanho três (10 mm de diâmetro) e 68 (53,12%) com tamanho quatro (13 mm de diâmetro). Dos 130 frangos aparentemente sadios, os dados do trabalho realizado por Pereira (2004) também indicaram que 80,76% dos casos eram representados por 44 (33,8%) bolsas de tamanho três (10 mm de diâmetro) e 61 (46,9%) com tamanho quatro (13 mm de diâmetro). No presente estudo, não houve relação estatística significativa entre o tamanho da bolsa de Fabrício e a presença do vírus da DIB pela RT-PCR. Este fato sugere que o tamanho da bolsa de Fabrício tenha sido influenciado pela presença do vírus da anemia infecciosa das galinhas, uma vez que todos os animais foram positivos pela PCR para aquela enfermidade. O vírus da anemia infecciosa das galinhas pode causar atrofia da bolsa de Fabrício, e em alguns casos pode haver diminuição do tamanho da mesma (BULOW, 2003)

O estudo microscópico foi importante para a classificação das lesões encontradas na bolsa de Fabrício e tem sido amplamente utilizado em muitos outros trabalhos (TANIMURA, 1995; RODRIGUES; PEREIRA, 2001; PEREIRA, 2004,). Os achados foram muito semelhantes aos descritos por Pereira (2004) e Tanimura et al (1995). À microscopia, foram observadas graves alterações foliculares na bolsa de Fabrício dos animais estudados, sendo que 77,34% apresentaram escore 3 de lesão. Este foi o escore de lesões mais grave e o resultado obtido está de acordo com o estudo realizado por Pereira (2004) no qual a maioria dos animais apresentou escore 3 de lesão no momento do abate.

Das aves positivas na RT-PCR todas apresentaram escore 2 ou 3 de lesão na bolsa, entretanto o maior número de bolsas no escore 3 foi encontrado em aves

negativas para o VDIB, o que pode sugerir mais uma vez a interferência de outro fator imunossupressor como o vírus da Anemia Infecciosa das Galinhas. A DIB e Anemia Infecciosa da Galinhas atuam de forma sinérgica na produção de lesões e na imunossupressão. (MORALES , 2009).

Histologicamente, as lesões no baço foram compatíveis com as descritas neste órgão quando afetado pelo vírus da anemia infecciosa das galinhas. A literatura descreve essas lesões como: redução de centros germinativos; proliferação de células reticulares, decréscimo do número de linfócitos e focos necróticos (BULOW,1991; BRENTANO, 2001). Algumas destas lesões, como depleção linfóide associada à hiperplasia de células reticulares também podem ocorrer na infecção pelo vírus da DIB e foram descritas neste estudo. Já na bolsa de Fabrício afetada pelo vírus da anemia infecciosa das galinhas a literatura descreve que microscopicamente são observados folículos de tamanhos variados com poucos linfócitos, aumento de tecido interfolicular e células linfóides com núcleos picnóticos e vacúolos no citoplasma. Lesões que podem se confundir com as provocadas pelo vírus da DIB, dependendo do estágio da infecção.

No presente trabalho, para detecção do vírus da DIB, foi amplificada a região variável do VP2 por ser a região que expressa os epítomos sorotipo-específicos, além de ser a proteína responsável pela resposta imune protetora contra a DIB (VAN DEN BERG, 2000; MONTASSIER, 2001). Diversos trabalhos também utilizaram a região variável VP2 na RT-PCR para classificar o vírus da DIB (JACKWOOD e JACKWOOD,1994; VAN DERNBERG, 2000; IKUTA et al., 2001; MAJÓ, et al, 2002).

Um estudo realizado por Gomes (2003) demonstrou que a sensibilidade do RT-PCR depende do par de oligonucleotídeos a ser utilizado, fato que foi comprovado neste trabalho. Foram utilizados dois pares de *primers* LVC 108 e 109 e LVC 128 e 129 e obtidos resultados positivos em diferentes amostras para cada RT-PCR . Os pares de *primers* amplificaram regiões diferentes de VP2, LVC 108 e 109 amplificaram 847pb, sendo este um fragmento grande e com isto podemos ter a perda da sensibilidade. O par LVC 128 e 129 amplificou 413 pb, um fragmento menor onde a sensibilidade da técnica foi maior no trabalho atual.

Apesar do par de *primers* menor ter promovido uma sensibilidade maior na RT-PCR, o uso dos dois pares foi imprescindível para melhor amplitude de detecção uma

vez que amostras negativas com LVC 108 e 109 foram positivas com LVC 128 e 129 e amostras positivas com LVC 108 e 109 foram negativas com LVC 128 e 129.

Na relação entre as aves positivas pelo RT-PCR para detecção do vírus da DIB e a presença da celulite encontramos significância, isto podendo ser explicado pelo quadro de imunossupressão causado pelo vírus, favorecendo o aparecimento de outras doenças, neste caso a celulite.

O diagnóstico para Anemia Infecciosa das Galinhas (AIG) foi solicitado como diagnóstico diferencial para a DIB, justificando a não relação das lesões na bolsa de Fabrício com a presença do vírus da DIB, mas sem interferência na relação com a celulite, já que os dois grupos estavam 100% positivos para AIG, pela PCR.

6 CONCLUSÃO

- 1) Lesões em placa de coloração amarelada no tecido subcutâneo de frangos de corte devem ser consideradas como celulite e, portanto, como critério para julgamento da carcaça na Inspeção Sanitária.
- 2) A gravidade das lesões microscópicas na bolsa de Fabrício favoreceu o aparecimento da celulite.
- 3) A utilização de dois pares de *primers*, que amplificaram regiões diferentes de VP2 aumentou a sensibilidade da RT-PCR para o vírus da DIB.
- 4) As lesões microscópicas mais graves na bolsa de Fabrício e o tamanho da bolsa não estavam relacionados com o vírus da DIB pela RT-PCR.
- 5) O vírus da DIB, detectado pela RT-PCR, favoreceu o aparecimento da celulite.

7 OBRAS CITADAS

ALVES, F. M. X.; PEREIRA, V. L.; NASCIMENTO, E. R.; GUIMARÃES, A. M. P.; ALMEIDA, D.O; TORTELLY, R. Celulite associada às lesões na bolsa de Fabrício de frangos de corte ao abate, sob inspeção sanitária. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, v. 14, n. 1, p 23-26. jan/abr. 2007.

ANDRADE, C. L. *Histopatologia e Identificação da Escherichia coli como agente causal da celulite aviária em frangos de corte*. Niterói, 2005. 61f. Dissertação (Mestrado em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal). Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói. 2005.

BAIÃO, N. C.; LARA, L. J. C.; ROCHA, J. S. R. *Manejo pré- abate*. *Ave World*.n. 33. p. 30-41, abr/maio. 2008.

BERNARDINO, A. Controle da Doença de Gumboro – Proposta Fort Dodge. In: II SIMPÓSIO DA DOENÇA DE GUMBORO, 2001, Campinas. *Anais....*Campinas: FACTA, 2001, p. 143-156.

BERNARDINO, A. Programas de vacinações. In: MENDES, A.; Naas, I. A.; Mendes, A. A. *Produção de Frangos de Corte*, FACTA: Campinas,356p., Cap 12, p. 179-203, 2004.

BOLIS, D. A.; PAGANINI, F. J.; SIMON, V. A.; ZUANAZE, M. F.; SCANAVINI-NETO, H.; CORREA, A. R.; ITO, N. M. K. Gumboro Disease: Evaluation of serological and anatomopathological reponses in vaccinated broiler chickens challenged with veryvirulent vírus strain. *Revista brasileira de Ciência Avícola*, Campinas, v. 5, n. 2, p.137-146, mai/ago. 2003.

BORDIN, E. L. Algumas Considerações Sobre Alterações Anatomopatologicas e Diagnóstico In: II SIMPÓSIO DA DOENÇA DE GUMBORO, 2001, Campinas. *Anais...* Campinas: FACTA, 2001, p. 74-77.

BRASIL. Portaria nº 210, de 10 de novembro de 1998. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento Técnico da Inspeção Tecnológica e Higiêncio-sanitária de carne de aves.

BRENTANO, L.. Fatores Intercorrentes à doença de Gumboro: Anemia Infecciosa das Galinhas. In: II SIMPÓSIO DA DOENÇA DE GUMBORO, 2001, Campinas. *Anais...* Campinas: FACTA, 2001, p. 54-63.

BRENTANO, L. Importância das doenças imunossupressoras na produção de frangos de corte. In: IV Seminário Internacional de Aves e Suínos – Avesui , p. 1-13, 2005.

BRIGGS, D. J.; WHITIFILL, C.E.; SKEELES, J. K.; STORY, J. K.; REED, K. D. Application of the positive/negative ratio method of analysis to quantitate antibody responses to infectious bursal disease virus using a commercially available ELISA. *Avian Diseases*, n. 30, p. 216-218, 1986.

CARDOSO, B. E.; PEREIRA, V. L. A. Controle da Doença de Gumboro – Proposta Lohmann. In: II SIMPÓSIO DA DOENÇA DE GUMBORO, 2001, Campinas. *Anais....*Campinas: FACTA, 2001, p. 141-142.

CARR, D.; SHAW, D.; HALVORSON, D. A.; RINGS, B.; ROEPKE, D. Excessive Mortality in market-age Turkeys Associated with Cellulitis. *Avian Diseases*, n. 40, p. 736-741, 1996.

DE HERDT, P.; DUCATELLE, R.; UYTTEBROEK, E.; SEP, A.; TORBEYNS, R. Significance of Infectious Bursal disease Serology in a Integrated Quality Control Program Under European Epidemiologic Conditions, *Avian Diseases*, n. 44, p. 611-17, 2000.

DI FABIO, J. Diagnóstico Sorológico da Doença de Gumboro. In: II Simpósio da Doença de Gumboro, 2001, *Anais...* Campinas: FACTA, 2001, p. 78-91.

FALLAVENA, L. C. B. Enfermidades da Pele e das Penas. In: BERCHIERI JR.; MACARI, M. *Doença das aves*, FACTA: Campinas, 2000, 800p, Cap. 2, Item 2.3, p. 37 - 42, 2000a.

FALLAVENA, L. C. B et al. Diagnosis of skin lesions in condemned or downgraded broiler carcasses – a microscopic and macroscopic study. *Avian Pathology*, n. 29, p. 557-562, 2000b.

FALLAVENA, L. C. B. Lesões Cutâneas em Frango de Corte: Causas, Diagnóstico e Controle. In: CONFERÊNCIA APINCO 2001 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2001, Campinas. *Anais...*Campinas : FACTA, 2001, p. 205-216.

FALLAVENA, L. C. B. Lesões Cutâneas em Frangos de Corte: Etiologia. In: CONFERÊNCIA APINCO 2005 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2005, Santos. *Anais...* Campinas: FACTA, 2005. 2 v. V. 1, p. 101-113.

IKUTA, N. Diagnóstico Molecular do Vírus da Doença de Gumboro. In: II SIMPÓSIO DA DOENÇA DE GUMBORO, 2001, Campinas. *Anais...* Campinas: FACTA, 2001. p. 93-101.

ITO, N. M. K.; MIYAJI, C. I.; LIMA, E. A.; OKABAYASHI, S. Doença de Gumboro: Revisão de Literatura, Avanços em Biotecnologia e Novos conhecimentos. 2006, p. 76.

JACKWOOD, D. J.; JACKWOOD, R. J. IBDV: Molecular differentiation of antigenic subtypes among serotype 1 virus. *Avian Diseases*, n. 38, p. 531-537, 1994.

JACKWOOD, D. J.; JACKWOOD, R. J. Molecular Identification of Infectious Bursal disease Virus Strain. *Avian Diseases*, n. 41, p. 97-104, 1997.

JOHNSON, D. C.; LUKERT, P. D.; PAGE, R. K. Field studies with convalescent serum and infectious bursal disease vaccine to control turkey coryza. *Avian Diseases*, n. 24, p. 386-392, 1980.

KNOBLICH, H. V.; SOMMER, S. E.; JACKWOOD, D. J. Antibody Titers to infectious Bursal Disease Virus in Broiler Chicks After Vaccination at One Day of age with Infectious Bursal Disease Virus and Marek's Disease Virus. *Avian Diseases*, n. 44, p.874-884, 2000.

KOUWENHOVEN. Control of very virulent Gumboro Disease in the Netherlands. *World Poultry Special – Gumboro*, p. 15-16. December, 1993.

KREAGER, K. ibd IN Egg-type Pullets. *World Poultry Special – Gumboro*, p. 19-20, dez. 1994.

KUMOR, L A et al. Cellulitis in Broiler Chickens: Epidemiological Trends, Meat Higiene, and Possible Human Health Implications. *Avian Diseases*, n.42, p. 285-291, 1998.

LECLERC, B.; FAIRBROTHER, J. M.; BOULIANNE, M.; MESSIER, S. Evaluation of the Adhesive Capacity of Escherichia coli Isolates Associated with Avian Cellulitis. *Avian Diseases*, n. 47, p. 21-31, 2003.

LEFFER, E. V. B. Considerações sobre o controle da doença de Gumboro. *Ave world*. São Paulo: Animal World, abr./mai. 2004. Número especial.

LIMA, M. C. P.; MANFIO, L.; KESKE, L. C. Os pré-requisitos para certificação de BBPP e HACCP. In: CONFERÊNCIA APINCO 2007, Campinas. *Anais...* Campinas: FACTA, 2007. p. 55-67.

LUKERT, P. D.; SAIF, Y. M. Infectious Bursal disease. In: CALNEK et al. *Diseases of Poultry*. 9. ed. IOWA State University Press: Ames, 1991, 929p. Cap. 28, p. 648-663.

LUKERT, P. D. Conceitos para uma vacinação bem sucedida. In: SIMPÓSIO DA DOENÇA DE GUMBORO, 1993, Santos. *Anais...* Campinas: FACTA, 1993a, p. 50-56.

LUKERT, P. D. A doença de Gumboro nos EUA. In: SIMPÓSIO DA DOENÇA DE GUMBORO, 1993, Santos. *Anais...* Campinas: FACTA, 1993b, p.36-39.

LUKERT, P. D. Using live vaccines in the presence of maternal antibody. *World Poultry Special – Gumboro*, p. 12-13, dez. 1994.

MAJÓ, N.; EL-ATTRACHE, J.; BANDA, A.; VILLEGAS, P.; RAMIS, A.; PAGÉS, A.; IKUTA, N. Molecular Characterization of Spanish Infectious Bursal Disease Virus Field Isolates. *Avian Diseases*, n.46, p.859-868, 2002.

Mc FERRAN, J. B.; Mc NULTY.; Mc KILLOP, E. R.; CONNER, T. J.; Mc CRACKEN, R. M.; COLLINS, D. S.; ALLAN, G. M. Isolation and serological studies with infectious bursal disease viruses from fowl, turkey and duck: Demonstration of a second serotype. *Avian Pathology*, n. 9, p. 395-404, p. 1980.

MESSIER, S.; QUESSY, S.; ROBINSON, Y.; DEVRIESE, L. A.; HOMMEZ, J.; FAIRBROTHER, J. M. Focal Dermatitis and Cellulitis in Broiler Chickens: Bacteriological and pathological Findings. *Avian Diseases*, n. 37, p. 839-844, 1993

MONTASSIER, H. J. Doença de Gumboro: Imunologia. In: II SIMPÓSIO DA DOENÇA DE GUMBORO, 2001, Campinas. *Anais...* Campinas: FACTA, 2001. p. 37-45.

MORALES, O. Doença infecciosa da bolsa. In: REVOLLEDO, L.; FERREIRA, A. J. P. *Patologia Aviária*, MANOLE: Barueri, 2009, 510p, Parte IV. Item 19, p. 178-192, 2009.

NORTON, R. A.; MARCKLIN, K. S.; McMURTREY, B. L.; The association of various isolates of *Escherichia coli* from the United States with induced cellulitis and colibacillosis in young broiler chickens. *Avian Pathology*, n. 29, p. 571-574, 2000.

NORTON, R. A.; BILGILIS, S. F.; McMURTREY, B. C. A reproducible model for the induction of avian cellulitis in broiler chicken. *Avian Diseases*, v. 41, p. 422-428, 1997.

NORTON, R. A.; MARCKLIN, K. S.; McMURTREY, B. L.; The association of various isolates of *Escherichia coli* from the United States with induced cellulitis and colibacillosis in young broiler chickens. *Avian Pathology*, n. 29, p. 571-574, 2000

ONDERKA, D. K.; HANSON, J. A.; McMILLAN, K. R.; ALLAN, B. *Escherichia coli* Associated Cellulites in Broilers: Correlation with Systemic Infection and microscopic Visceral Lesions, and Evaluation for skin Trimming. *Avian Diseases*, n. 41, p. 935-940, 1997.

PASS, D. A. Integumentary System. In: RIDDELL, C. *Avian Histopathology*. 2. ed. American Association of Avian Pathology, 1996. Cap. 13, p. 219-229.

PEIGHAMBARI, S. M; VAILLANCOURT, J. P.; WILSON, R. A.; GYLES, C. L. Characteristics of *Escherichia coli* Isolates from Avian Cellulites. *Avian Diseases*, n. 39, p. 116-129, 1995.

PEREIRA, R.; ALLGAYER, M. C.; FALLAVENA, L. C. B.; MORAES, H. L. S.; FITTÉL, A. P.; MOTTA, A. C.; SANTOS, L. R.; SALLE, C. T. P. Doença Infecciosa da Bursa (DIB) – Comparação entre Monitoria por Exame Histopatológico e Bursometria. In: XI ENCONTRO NACIONAL DE PATOLOGIA VETERINÁRIA, 2003, Botucatu. Anais... Botucatu: UNESP, 2003. p. 138.

PEREIRA, V. L. A. *Qualidade de frangos de corte ao abate pela relação entre peso, doença de gumboro e algumas enfermidades associadas*. Niterói, 2004. 75f. Tese (Doutorado em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói. 2004.

RODRIGUES, O; PEREIRA, A. R. Diagnóstico clínico e Envio de Material ao Laboratório. In: II SIMPÓSIO DA DOENÇA DE GUMBORO, 2001, Campinas. *Anais...* Campinas: FACTA, 2001. p. 67-73.

ROSENBERGER, J. K; CLOUD, S. S. Isolation and characterization of variant infectious bursal disease viruses. *J. Am Vet Assoc* 189-357, 1985

ROSALES, A G. Programas de control y evaluación de la inmunidad – en pollos de engorde y reproductores pesados. *World Poultry – suplemento*, p. 21-23, 1995.

SAIF, Y. M. Infectious bursal disease vírus types. Proc 19th Nat Meet *Poultry Health Condemn*, 105-107, 1984

SAIF, Y. M. Pruebas e laboratorio versus pruebas en aves vivas. *World Poultry* – suplemento, p. 09, 1995.

SALLE, C. T. P. Interpretação de resultados laboratoriais. . *Ave World*, n. 33, Abr/Maio 2008, p. 48-53.

SILVA, E. N.; MOTA, M. P. Celulite em frangos de corte. Disponível em: <http://www.aveworld.com.br/usuario/gerencialnavegacaophp>. Acesso em 12 dez. 2003.

SELLERS, H. S.; VILLEGAS, P. N.; SEAL, B. E.; JACKWOOD, D. J. Antigenic and molecular characterization of three infectious bursal disease virus field isolates. *Avian Diseases*, v. 43, p.198-206, 1999.

SIMON, V.; ISHIZUKA, M. Doenças Virais – Doença Infecciosa da Bolsa de Fabrício – DIB. In: BERCHIERI JR.; MACARI, M. *Doença das aves*, FACTA: Campinas, 2000, 800p, Cap. 5, Item 5.5, p. 301 – 314, 2000.

TANIMURA, N.; TSUKAMOTO, K.; NAKAMURA, K.; NARITA, M.; MAEDA, M. Association between Pathogenicity of Infectious Bursal Disease vírus and Viral Antigen Distribution Detected by Immunohistochemistry. *Avian Diseases*, v. 39, p. 9-20, 1995.

TESSARI, E. N. C.; CASTRO, A. G. M.; CARDOSO, ^a L. S. P.; KANASHIRO, M. A. I. Ocorrência da Doença de Gumboro em Aves de Postura Causadas por Cepas Hipervirulentas. *Arquivo Instituto Biológico*, São Paulo, v. 68, n. 1, p 115-117, jan./jun., 2001.

THRUSFIELD MICHAEL. *Veterinary Epidemiology*. Second Edition. Blackwell Publishing, 483 p. 1995

VAN DEN BERG, T. Acute bursal disease in poultry: a review. *Avian Pathology*, n. 29, p. 571-574, 2000

VAN DEN BERG, T.; ETERRADOSSI, N. Doença Infecciosa Bursal Aguda em Aves. In: II SIMPÓSIO DA DOENÇA DE GUMBORO, 2001, Campinas. *Anais...* Campinas: FACTA, 2001, p. 103-131.

8 ANEXOS

8.1 REAGENTES E SOLUÇÕES DA PCR

8.1.1 PBS pH 7.2

KH₂PO₄ 0,68g

NaCl 8,5g

NaOH 0,15 g

Água destilada 1000mL

Colocar em frasco de vidro e autoclavar por 15 minutos

8.1.2 Gel de Agarose a 1,5%

Agarose Ultra Pura 3,75g

Água destilada 225 mL

Levar esta solução ao microondas até que o Agar derreta totalmente

Adicionar 25mL de TBE 5X

8.1.3 Tampão de arrasto

Azul de bromofenol 0,25 mL

Sucrose 40g

Água destilada q.s.p 100mL

Armazenar a 4 C

8.1.4 Tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 5X base 54g

Ácido bórico 27,5g

EDTA 0,5M (pH 8.0)..... 20 mL

Água destilada q.s.p..... 1000mL

8.1.5 Solução de Brometo de Etídio (5 µg/mL)

Brometo de etídio (10,0 mg/mL) 100 µL

Água destilada q.s.p 200mL