UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM HIGIENE VETERINÁRIA E PROCESSAMENTO TECNOLÓGICO DE P.O.A.

VIRGINIA LÉO DE ALMEIDA PEREIRA

QUALIDADE DE FRANGOS DE CORTE AO ABATE PELA RELAÇÃO ENTRE PESO, DOENÇA DE GUMBORO E ALGUMAS ENFERMIDADES ASSOCIADAS

VIRGINIA LÉO DE ALMEIDA PEREIRA

QUALIDADE DE FRANGOS DE CORTE AO ABATE PELA RELAÇÃO ENTRE PESO, DOENÇA DE GUMBORO E ALGUMAS ENFERMIDADES ASSOCIADAS

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para a obtenção do Grau de Doutor. Área de Concentração em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de P.O.A.

Orientador: Prof. DR. ELMIRO ROSENDO DO NASCIMENTO

VIRGINIA LÉO DE ALMEIDA PEREIRA

QUALIDADE DE FRANGOS DE CORTE AO ABATE PELA RELAÇÃO ENTRE PESO, DOENÇA DE GUMBORO E ALGUMAS ENFERMIDADES ASSOCIADAS

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para a obtenção do Grau de Doutor. Área de Concentração em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de P.O.A.

Aprovada em 30 de março de 2004

Prof. Dr. Elmiro Rosendo do Nascimento Universidade Federal Fluminense Prof. Dr. Getúlio Almeida de Mendonça Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro Profa. Dra Maria da Graça Fichel do Nascimento Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária EMBRAPA AGROINDÚSTRIA DE ALIMENTOS Profa. Dra. Maíra Halfen Teixeira Liberal Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro PESAGRO-RIO

Prof. Dr. Rogério Tortelly Universidade Federal Fluminense



AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos aqueles que direta ou indiretamente colaboraram na execução deste trabalho.

Em especial dedico a minha gratidão:

Ao prof. Elmiro Rosendo do Nascimento, pelos ensinamentos, estímulo, e amizade, concedidos na orientação desse trabalho;

À Rita de Cássia Figueira Silva, por sua inestimável ajuda, pelo seu espírito de colaboração, incentivo nas horas mais difíceis, apoio e amizade que se consolidou durante o processo de desenvolvimento desse trabalho;

Às minhas colegas Patrícia Maria Rocha Gonçalves, pela ajuda nas coletas de material, Juliana Ferreira de Almeida e Sabrina Fagundes, pelo dia-a-dia no laboratório e às três, pelo carinho e companheirismo;

À profa. Maria Lúcia Barreto, à estagiária Flaveli Muraroli e à aluna Juliana Bomfim de Ataíde Trindade, do Núcleo de Animais de Laboratório da UFF, pelo auxílio no preparo das amostras para análise;

Ao prof. Rogério Tortelly e aos seus monitores Davi de Oliveira Almeida e Fernanda Martinez Xavier Alves, pelo auxílio na execução dos exames histopatológicos;

Ao amigo Môsar Lemos, por todos esses anos de amizade e por me substituir em outras atividades para que eu pudesse realizar esse curso;

Ao sr. Dráusio Ferreira de Paiva, secretário da coordenação de pós-graduação, pela atenção, interesse e eficiência no desempenho de suas atividades junto aos alunos de pós-graduação;

Às empresas avícolas em São José do Vale do Rio Preto, em especial ao sr. José Bravo Scistowicz, pelo fornecimento das aves para o estudo;

À Lohmann Saúde Animal, e aos meus amigos Beatriz Cardoso e Oscar Morales, pelas oportunidades oferecidas, incentivo e fornecimento das enzimas de restrição;

Ao Laboratório Biovet S/A, pelo fornecimento de material, cessão de instalações e equipamentos para a execução das etapas de sorologia, especialmente aos diretores Paulo Eduardo Alves Corrêa, Antonio Roberto Alves Corrêa e Roberto Apollaro; e à Nicole de Assis Pereira, Sandra Fernandez e Marinalva Paula de Oliveira do Centro de Pesquisas, pela ajuda preciosa na execução da sorologia e pesquisa das técnicas moleculares;

À Adriana Dias Gomes, doutoranda do Laboratório de Virologia Comparada do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, pela confirmação da RT/PCR para Gumboro.

SUMÁRIO

RESUMO, p. 10

ABSTRACT, p. 11

1 INTRODUÇÃO, p. 12

2 REVISÃO DE LITERATURA, p.14

- 2.1 A PRODUÇÃO E A COMERCIALIZAÇÃO BRASILEIRAS DA CARNE DE FRANGOS, p.14
- 2.2 A DOENÇA ÎNFECCIOSA DA BOLSA (DIB) OU DOENÇA DE GUMBORO, p.18
- 2.2.1 O vírus, p.18
- 2.2.2 Sinais clínicos e lesões da DIB, p.20
- 2.2.3 Diagnóstico da DIB, p.22
- 2.2.4 Prevenção e Controle, p.24
- 2.3 ENFERMIDADES FAVORECIDAS PELA DIB E CONSEQÜENTES PERDAS EM FRANGOS DE CORTE, p.25

3 MATERIAL E MÉTODOS, p.28

- 3.1 COLETA DE MATERIAL, p.29
- 3.1.1 Coleta de sangue das aves, p.29
- 3.1.2 Pesagem das aves, p.30
- 3.1.3 Necrópsia, p.31
- 3.1.4 Coleta, medição e pesagem da bolsa de Fabrício, p.32
- 3.2 EXAME HISTOPATOLÓGICO DAS BOLSAS DE FABRÍCIO, p.332
- 3.3 ELISA PARA DIB, p.33
- 3.3.1 Reagentes, p. 33
- 3.3.2 Preparo das amostras, p.34
- 3.3.3 Procedimento de teste, p.34
- 3.3.4 Validação do teste, p.35
- 3.4 IDENTIFICAÇÃO DO VÍRUS DA DIB POR RT/PCR, p.35
- 3.4.1 Extração do RNA, p.36
- 3.4.2 Primers, p.36
- 3.4.3 RT/PCR, p.37

- 3.4.3.1 Desnaturação, p.37
- 3.4.3.2 RT, p.37
- 3.4.3.3 PCR, p.37
- 3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA, p.38

4 RESULTADOS, p.39

- 4.1 PESAGEM DAS AVES, NECRÓPSIA, MEDIÇÃO E PESAGEM DAS BOLSAS DE FABRÍCIO, p.39
- 4.2 EXAME HISTOPATOLÓGICO DAS BOLSAS DE FABRÍCIO, p.41
- 4.3 ELISA, p.43
- 4.4 RT/PCR, p.44
- 4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA, p.44
- 5 DISCUSSÃO, p.49
- 6 CONCLUSÃO, p.53
- 7 OBRAS CITADAS, p.54
- 8 OBRAS CONSULTADAS, p.62
- 9 APÊNDICES, p.63
- 10 ANEXOS, p.65

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURA 1: Estrutura e Organização do Genoma do VDIB, p.19
- FIGURA 2: Caixa de transporte com capacidade para 10 frangos de corte, p.29
- FIGURA 3: Caminhões de transporte de frangos de corte ao matadouro, p.29
- FIGURA 4: Área de anatomia patológica do LBA da PESAGRO-RIO, p. 30
- FIGURA 5: Coleta de sangue na veia braquial de frango de corte, p.30
- Figura 6: Pesagem de frango de corte em balança suspensa, p.31
- **FIGURA 7:** Frango de corte. Intestino delgado. Presença de formas de evolução de *Eimeria sp.*HE. 100X, p.40
- **FIGURA 8:** Dispersão por peso e tamanho da bolsa de Fabrício dos frangos de corte estudados, p.40
- **FIGURA 9**: **A.** Frango de corte. Bolsa de Fabrício. Discreta rarefação linfocitária cortical folicular, arquitetura do folículo preservada, escore 1. HE.100X. **B.** Aumento maior. HE.200X, p.41
- **FIGURA 10: A.** Frango de corte. Bolsa de Fabrício. Edema, atrofia severa de folículos, rarefação linfóide, escore 2 de lesões na bolsa. HE.40X. **B.** Aumento maior.HE.200X, p.42
- **FIGURA 11: A.** Frango de corte. Bolsa de Fabrício. Edema, atrofia severa dos folículos, destruição total dos folículos com presença de cistos de diâmetros variados, necrose e fibrose, escore 3.HE. 40X. **B.** Aumento maior.100X, p.42
- FIGURA 12: Frango de corte. Bolsa de Fabrício. Atrofia e necrose dos folículos com intensa destruição folicular, perda da demarcação dos limites foliculares, fibrose e infiltrado leucocitário intersticial, escore 3.HE.100X, p.42
- **FIGURA 13:** Frango de corte. Bolsa de Fabrício. Atrofia severa com depleção linfóide e presença de cistos na maioria dos folículos, escore 3.HE.40X, p.43
- **FIGURA 14:** Dispersão por coeficiente S/P ao ELISA nos 130 frangos de corte investigados ao abate, p.43
- FIGURA 15: Frango de corte. Bolsa de Fabrício. Ausência de lesões, folículos íntegros com população linfóide normal e epitélio preservado, escore 0. HE.100X, p.64
- Figura 16: Bolsa de Fabrício medida no bursômetro medida errada, p.65
- Figura 17: Bolsa de Fabrício medida no bursômetro medida correta, p.66

LISTA DE QUADROS E TABELAS

- QUADRO 1: COMPARAÇÃO DO CONSUMO PER CAPITA (Kg/HAB/ANO) DE CARNE DE FRANGO, BOVINA E SUÍNA, NO BRASIL, NO PERÍODO DE 1992 A 2002, P.15
- QUADRO 2: PRODUÇÃO MUNDIAL DE CARNE DE FRANGOS NO PERÍODO DE 1997 A 2002, P.16
- QUADRO 3: EXPORTAÇÃO MUNDIAL DE CARNE DE FRANGOS NO PERÍODO DE 1997 A 2002, P.16
- TABELA 1: VALORES DESCRITIVOS DAS VARIÁVEIS ESTUDADAS, P.44
- **TABELA 2:** VALORES DE REGRESSÃO PARA PESO COMO VARIÁVEL DEPENDENTE FRENTE A SEIS FATORES INDEPENDENTES, P.45
- TABELA 3: ÍNDICES PB/PC E PB/TB COMO FATORES PREDITIVOS NO ESCORE DE LESÕES MICROSCÓPICAS NA BOLSA DE FABRÍCIO DE FRANGOS DE CORTE AO ABATE, P.46
- **TABELA 4:** PROPORÇÃO DE ENFERMIDADES DETECTADAS À NECRÓPSIA EM FRANGOS DE CORTE AO ABATE COM LESÕES MICROSCÓPICAS NA BOLSA FABRÍCIO, P.47
- **TABELA 5:** PROPORÇÃO DAS ENFERMIDADES DETECTADOS À NECRÓPSIA EM RELAÇÃO AO PESO DE FRANGOS DE CORTE AO ABATE, P.48
- **TABELA 6:** PRESENÇA E AUSÊNCIA DE COCCIDIOSE EM FRANGOS DE CORTE AO ABATE EM RELAÇÃO AO ESCORE DE LESÕES MICROSCÓPICAS NA BOLSA DE FABRÍCIO, P.48
- QUADRO 4: CLASSIFICAÇÃO DA BOLSA DE FABRÍCIO NO BURSÔMETRO, P.66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABEF Associação Brasileira de Exportadores de Frango

AcM Anticorpos Maternos

APPCC Analise de Perigos e Pontos Críticos de Controle

BPG Boas Práticas de Gerenciamento

BPF Boas Práticas de Fabricação

BuW/BW "Bursal Weight/Body Weight rate"

BuW/BuL "Bursal Weight/Bursal Length rate"

CDPA Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária

COCCI Presença ou ausência de coccidiose

DIB Doença Infecciosa da Bolsa ou Doença de Gumboro

DIPOA Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal

ESCORE Grau de severidade de lesões histológicas na bolsa de Fabrício

ELISA "Enzyme-Linked Sorbent Assay"

EUA Estados Unidos da América

HE Hematoxilina e Eosina

IBD "Infectious Bursal Disease"

ICB Instituto de Ciências Biológicas

IPARDES Instituto Paranaense de Desenvolvimento Econômico e Social

LBA Laboratório de Biologia Animal

MAPA Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MDIC Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior

OIE "Officie Internacional des Epizooties"

OMC Organização Mundial do Comércio

ORF "Open Reading Frame"

PB Peso da Bolsa de Fabrício

PB/TB Indice peso da bolsa / tamanho da bolsa

PB/PC Índice peso da bolsa / peso corporal
PC Peso Corporal do Frango de Corte

PESAGRO-RIO Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro

RIISPOA Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de

Origem Animal

RT/PCR "Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction"

SN Soroneutralização

TB Tamanho da Bolsa de Fabrício

UBA União Brasileira de Avicultura

UE União Européia

UFMG Universidade Federal de Minas Gerais

UFRGS Universidade Federal do Rio Grande do Sul

VDIB Vírus da Doença Infecciosa da Bolsa

RESUMO

O setor avícola tem cada vez mais importância no contexto do agronegócio brasileiro. A preocupação com a segurança alimentar e a saúde animal tem acompanhado e favorecido essa evolução. Entretanto, problemas, como a imunodepressão, continuam a provocar grandes prejuízos na avicultura industrial, por propiciar infecções secundárias, interferir na eficiência dos programas vacinais e aumentar o uso de antibióticos. Dentre as causas de imunodepressão em aves, destaca-se a Doença Infecciosa da Bolsa (DIB). O presente estudo epidemiológico transversal teve como objetivo relacionar o peso de frangos de corte no dia de abate com os seguintes fatores preditivos: alterações na bolsa de Fabrício observadas pela histopatologia e pela avaliação dos índices morfométricos (peso da bolsa/peso corporal - PB/PC e peso da bolsa / tamanho da bolsa - PB/TB); resposta sorológica pelo ELISA; e presença de outras enfermidades como a coccidiose, aerossaculite, pericardite, verminose. Foram utilizados 130 frangos de corte em idade de abate, examinados, pesados e com uma amostra de sangue colhida. A bolsa de Fabrício foi medida, pesada e armazenada, metade em formalina a 10% para histopatologia, e metade congelada para a RT/PCR. Os índices PB/TB e PB/PC foram calculados. As lesões histológicas foram classificadas de acordo com a severidade: escore 0 = sem lesões; escore1: discretas lesões, leve hiperplasia, discreta rarefação linfóide folicular; 2= sinais de inflamação, edema, atrofia de folículos, rarefação linfóide, degeneração e necrose folicular ; escore 3 = atrofia severa, cistos foliculares e epiteliais, necrose e fibrose. Aves com lesões intestinais foram investigadas para diagnóstico de coccidiose. Os resultados mostraram que lesões na bolsa favoreceram o aparecimento de enfermidades como coccidiose, aerossaculite, lesão na cabeça do fêmur, verminose, hemorragia na ponta da asa, lesão no coxim plantar de frangos de corte em idade de abate (p<0,05). Essas doenças obtiveram relação significativa com o peso dos frangos ao abate (p<0,05). Lesões na bolsa de Fabrício favoreceram a coccidiose e ambos foram fatores preditivos significativos no peso de frangos de corte (p<0,05). Os índices PB/PC e TB/PB foram fatores preditivos de lesões na bolsa (p<0,05). Apesar de vacinados, os frangos de corte em idade de abate sofreram desafio pelo VDIB, confirmado pelo RT/PCR, sem sinais clínicos, mas com quadro de imunodepressão demonstrado por alterações na bolsa de Fabrício, lesões microscópicas e favorecimento ao aparecimento de outras enfermidades que depreciaram o peso dessas aves.

Palavras-chave: Frangos de corte, Doença de Gumboro, ELISA, Histopatologia

ABSTRACT

The poultry industry is a very important segment of the Brazilian agribusiness. The concern in food safety and animal health have followed and favored this development. However, problems as immunodeppression continues to provoke big losses in the poultry industry, because they favor secondary infections, interfere with vaccines efficience and increase the use of drugs. Amongst the immunodepresion causes, it is distinguished the Infectious Bursal Disease (IBD). The present transversal epidemiologic study had the objective of relating broilers weight at slaughter to following predictive factors: bursal changes by histopathology and morphometric meansurement rates (bursal weight/bursal length – BuW/BuL e bursal weight/body weight – BuW/BW); antibody responses by ELISA; and other diseases as coccidiosis, airsaculitis, pericarditis and verminosis. A total of 130 broilers were used at slaughter age. All of them were examinated, weighted and blood samples were collected. The bursa of each bird was mensured, weighted and stored, half in 10% phormalyna for histopathology, half were frozen for RT/PCR. The BW/BL and BuW/BW rates were calculated. The histopathology lesions were classified in accordance with their severity: score 0 = no lesions; score 1 = mild lesions, mild hyperplasia, mild lymphoid follicles rarefaction; score 2= inflammatory signs, edema, follicle atrophy, lymphoid depletion, follicles degeneration and necrosis; score 3 = severe follicles atrophy, follicles and epithelial cysts, necrosis and fibrosis. Intestinal lesions were diagnosed as coccidiosis. As results it was found that bursal lesions favored other diseases as coccidiosis, airsacculitis, pericarditis, femoral head necrosis, verminosis, wing hemorragy and scabs on foot pad (p<0,05). These diseases had a significative relation with body weight (p<0,05). Bursal lesions favored coccidiosis and both of them were predictives factors of body weight (p<0,05). The BuW/BuL and BuW/BW were found to be predictive factors of bursal lesions (p<0,05). Although vaccinated, the broilers were found to be infected by RT/PCR, but no IBD clinical signs were seen. On the other hand the bursal changes and microscopic lesions besides the other diseases favored the idea of immunodepresion on that affected the body weight of the studied birds.

1 INTRODUÇÃO

O Brasil tem muitas condições que favorecem a atividade avícola: clima tropical, disponibilidade de terras agricultáveis para o plantio de grãos, mão-de-obra disponível, ciência e tecnologia voltadas para o setor, e mercado consumidor em expansão.

A indústria avícola representa atualmente um dos mais importantes setores do agronegócio no Brasil. Entre 1997 e 2002, a produção de carne de frango do país passou de pouco menos de 9% da produção mundial para 12% (ABEF, 2004). O país está em segundo lugar na lista dos maiores produtores e exportadores da carne de frangos e derivados, com crescente aumento no consumo e no volume da carne exportada. Nas últimas três décadas o setor cresceu aproximadamente 10% ao ano, o que reflete a qualidade do produto nacional.

Com todo esse crescimento, a evolução tecnológica na produção e a preocupação com os aspectos sanitários também aumentaram. Hoje programas como o APPCC (Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle) e BPG (Boas Práticas de Gerenciamento) ou BPF (Boas Práticas de Fabricação) têm sido implementados em todas as fases do processo produtivo, desde o incubatório até a expedição da carne industrializada. Estes programas visam garantir a qualidade do produto brasileiro e atender às exigências do Comércio Internacional. Essas exigências são regulamentadas pelo "Codex Alimentarius", órgão normativo da Organização Mundial do Comércio (OMC) para a proteção da saúde humana face aos riscos de doenças transmitidas por alimentos ou através de acidentes envolvendo alimentos (OLIVEIRA, 1995; MENDES, 2001; BRASIL, 2002; DELAZARI, 2003).

.

Entretanto. todo esse progresso, problemas mesmo com como imunodepressão continuam causando grandes perdas na avicultura industrial e favorecem o aparecimento de outras enfermidades que geram aumento na mortalidade, aumento no uso de drogas e quimioterápicos, além de manifestações como caquexia ou septicemia que aumentam as taxas de condenação. A imunodepressão é uma alteração inaparente, e normalmente os sintomas observados nas aves estão relacionados às doenças favorecidas por ela. Muitas vezes nos exames "ante-mortem" ou na inspeção sanitária durante o abate de frangos de corte são encontradas lesões compatíveis com infecções bacterianas, infestações por parasitas, caquexia, magreza, que podem ocorrer por incapacidade das aves de responder às vacinações ou às infecções, em função da deficiência provocada no sistema imune e determinam a condenação das aves (BRASIL, 2001; BRASIL, 2003; ROSALES, 1999; FALLAVENA, 2001; MENDES, 2001).

É importante que as causas primárias das lesões encontradas sejam pesquisadas para que se possa atuar na origem do problema. A qualidade da carne de frango é determinada durante a criação e não pode ser melhorada no processamento.

Dentre os fatores de imunodepressão em aves um dos mais importantes é a doença de Gumboro ou Doença Infecciosa da Bolsa (DIB) por provocar alta mortalidade nos casos de manifestação clínica da doença ou induzir grandes prejuízos já mencionados, nos quadros subclínicos, quando a imunodepressão prevalece. Os problemas sanitários mais comuns associados à DIB incluem doenças respiratórias, como micoplasmose e bronquite; infecções bacterianas, como colibacilose e clostridiose; doenças parasitárias, como coccidiose e verminose.

O presente trabalho é um estudo epidemiológico transversal que teve como objetivo relacionar o peso vivo de frangos de corte na saída para o abate com as alterações na bolsa de Fabrício compatíveis pela DIB, resposta sorológica contra a DIB e a presença de outras enfermidades.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A PRODUÇÃO E A COMERCIALIZAÇÃO BRASILEIRAS DA CARNE DE FRANGOS

A carne de frango e os produtos derivados representam uma eficiente e atrativa fonte de proteínas na alimentação humana por várias razões: o período relativamente curto para produção, no caso de frangos de corte, 7-8 semanas; o pequeno espaço físico necessário; e a nutrição fornecida unicamente através das rações, sem necessidade de nenhuma complementação. Além disso, os subprodutos gerados das criações (cama/fezes, etc.) podem ser reciclados em outras áreas da agricultura. Assim a produção avícola, de intenso e contínuo crescimento, é um dos mais importantes setores na agropecuária (UE/BÉLGICA, 2002).

O consumo brasileiro anual de carne de frangos cresceu de 16,8 Kg/habitante/ano em 1992 para aproximadamente 33,8 Kg per capita em 2002, aproximando-se do consumo da carne bovina (**Quadro1**). Esse salto se deve, entre outros fatores, ao desenvolvimento da indústria avícola oferecendo novos produtos, divulgando a qualidade e os benefícios nutricionais da carne de frango aos consumidores, e garantindo a qualidade dos produtos (CASTILLO & CUSTÓDIO, 2002; ABEF, 2004).

QUADRO 1: COMPARAÇÃO DO CONSUMO PER CAPITA (Kg/HAB/ANO) DE CARNE DE FRANGO, BOVINA E SUÍNA, NO BRASIL, NO PERÍODO DE 1992 A 2002.

CONSUMO PER CAPITA (Kg/HB/ANO) DE CARNE NO							
Ano	Frangos	Suínos	Bovinos				
1992	16,8	7,9	38,9				
1993	18,1	8,3	37,0				
1994	19,2	8,4	36,4				
1995	23,3	9,2	39,3				
1996	22,2	9,6	41,4				
1997	24,0	9,3	39,0				
1998	26,3	9,9	37,5				
1999	29,1	10,7	35,6				
2000	29,9	10,9	36,5				
2001	31,8	10,9	37,2				
2002	33,8	13,8	35,8				

Fonte: Adaptado de MENDES & SALDANHA, 2004

O Brasil é o segundo maior produtor de frangos de corte do mundo (QUADRO 2), com uma produção de 7.842.950 toneladas de carne em 2003. Ocupa a segunda posição mundial como país exportador de carne de frango (QUADRO 3) com a venda de 1.922.042 toneladas em 2003 (UBA, 2004). Para alcançar essa posição o processamento industrial e a inspeção industrial e sanitária sofreram enormes evoluções no esforço de adequar os produtos às exigências do mercado. períodos históricos foram destacados na evolução industrial avícola, tanto no que diz respeito à produção quanto às modificações no órgão de controle oficial – DIPOA/ Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Nos anos 70, com a primeira Norma Técnica (decreto 73.116 de 7/12/1973), na época chamada "Lei da Federalização", houve o aprimoramento do parque fabril em termos de instalações e equipamentos. Pouco se falava nos aspectos higiênicos e sanitários como exigência de qualidade de produto. Na década de 80 as Normas Técnicas visavam os aspectos da tecnologia voltados para o estabelecimento de controles preventivos da qualidade. Por fim, os anos 90 trouxeram qualidade e competitividade: o padrão de identidade e qualidade da carne de frango tornou-se o objetivo primordial do segmento (OLIVEIRA, 1995; BRASIL, 2002).

Quadro 2: Produção Mundial de Carne de Frangos no Período de 1997 a 2002

PRODUÇÃO DE CARNE DE FRANGO NO PERÍODO DE 1997- 2002 (1000 toneladas)							
Ano	Mundial	Estados Unidos	Brasil	China	União Européia	México	
1997	50.907	12.497	4.461	2.650	6.501	1.442	
1998	53.078	12.763	4.875	3.450	6.754	1.599	
1999	55.957	13.618	5.526	4.400	6.692	1.732	
2000	58.518	13.944	5.976	5.050	6.686	1.825	
2001	60.269	14.267	6.736	5.200	6.756	1.928	
2002	61.892	14.764	7.517	5.400	6.715	1.915	

Fonte: ABEF, 2004

Quadro 3: Exportação Mundial de Carne de Frangos NO PE'RIODO DE 1997 a 2002

	EXPORTAÇÃO DE CARNE DE FRANGO NO PERÍODO DE 1997-2002 (1000 toneladas)							
Ano	EUA	Brasil	Hong Kong	China	França			
1997	2.116	650	557	350	321			
1998	1.978	612	572	323	373			
1999	2.080	771	660	375	340			
2000	2.231	907	710	464	290			
2001	2.521	1.249	775	489	275			
2002	2.208	1.600	780	400	260			

Fonte: ABEF, 2004

Do ponto de vista de saúde pública, os conceitos higiênico-sanitários e de qualidade não podem ser considerados isoladamente. Um produto pode atender aos padrões de qualidade usualmente aceitos, relativos às condições físicas e sensoriais, e estar sanitariamente inadequado, porque contém agentes ou substâncias prejudiciais a saúde. O contrário também é possível. É necessário antes de se considerar a qualidade propriamente dita do produto, do aspecto sanitário em sentido amplo, que exista uma preocupação relativa à higiene, desde a produção até

a mesa do consumidor (OLIVEIRA, 1995; CASTILLO & CUSTODIO, 2002; DELAZARI, 2003).

A portaria nº 46 do MAPA, de 10 de fevereiro de 1998, determina que todas as indústrias de produtos de origem animal devem implantar, de modo gradual, os princípios do "APPCC", hoje aplicados na maioria das grandes empresas avícolas brasileiras, principalmente aquelas que exportam (BRASIL, 2002; MENDES, 2001; DELAZARI, 2003).

Em função do reconhecimento da aplicação dessas medidas no que se refere à segurança alimentar e da grande evolução no controle de doenças, no que se refere à saúde das aves, o consumo de carne de aves vem aumentando, o que favorece a produção avícola. Apesar desse grande avanço em relação à sanidade, as doenças imunodepressivas virais causam ainda grande impacto econômico pelas perdas diretas, provocadas pela mortalidade, e indiretas, relacionadas aos seus efeitos imunodepressores associados a outros fatores, que afetam o crescimento das aves e aumentam as condenações de carcaças. Provocam ainda o aumento no uso de antimicrobianos para combater infecções oportunistas, o que também guarda relação com a saúde humana considerando-se que resíduos dessas substâncias podem permanecer na carne (EU/BÉLGICA, 2002).

Esses problemas têm relação direta com o potencial da produção agrícola para o desempenho exportador brasileiro. As barreiras tarifárias têm sofrido progressivas reduções com o desenvolvimento do comércio exterior e o aumento de políticas de acordos comerciais internacionais. A expectativa é de que sejam cada vez mais reduzidas. Mas, paralelamente, pela complexidade das economias, as barreiras não-tarifárias vêm ganhando importância como nova forma de proteção aos comércios nacionais (MDIC, 2004). Alguns países importadores fazem exigências, tais como: 1) atendimento ao programa de análises microbiológicas e físico-químicas para carne de aves e água de abastecimento; 2) cumprimento da legislação referente à trânsito animal e respectiva documentação; 3) atendimento a planos de controle de resíduos biológicos e químicos, como organoclorados, antibióticos, metais pesados e outros, em produtos de origem animal; 4) atendimento ao Código Zoosanitário Internacional (medida adotada, por exemplo, pela Argentina que exige que as aves procedam de área de 10 Km livre de Doença de Gumboro, Bronquite Infecciosa, Laringotraqueíte, Síndrome da Cabeça Inchada, Salmonelose

e Hepatite por Corpúsculo de Inclusão) (DICKEL, 2004). Essas exigências comerciais devem cumprir um requisito de legitimidade internacional: no caso de barreiras sanitárias ao comércio de alimentos, devem ser regidas pelo "Codex Alimentarius", órgão de referência da OMC, para assuntos de qualidade e segurança alimentar (DICKEL, 2004).

O Brasil exporta para mais de cem países, atualmente. Isso atesta a qualidade e a competitividade do frango produzido no país (MENDES & SALDANHA, 2004).

A qualidade dos alimentos na atualidade não é um diferencial de marca, e sim uma condição ou fator de compra. Isto porque as normas e exigências no controle dos alimentos estão globalizadas e impostas pelo comércio internacional (DELAZARI, 2003).

2.2 A Doença Infecciosa da Bolsa (DIB) ou Doença de Gumboro

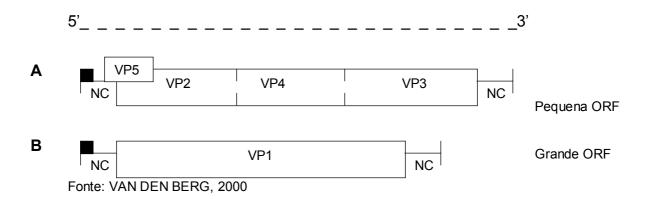
A DIB é uma infecção viral aguda, altamente contagiosa, que afeta aves jovens. Seu alvo primário é o tecido linfóide, principalmente a bolsa de Fabrício. A doença foi descrita pela primeira vez por Cosgrove em 1962, após surtos ocorridos próximos à região de Gumboro, Delaware, Estados Unidos da América (EUA) (LUKERT & SAIF, 1991).

2.2.1 O Vírus

O vírus da DIB (VDIB) pertence à família *Birnaviridae*, e seu genoma consiste de uma molécula RNA de fita dupla. Tem simetria icosaédrica e não possui envelope. A estrutura e a organização do genoma (*FIGURA 1*), consistem de um segmento maior, de aproximadamente 3400 pares de base, denominado "fita A" e que contém duas áreas de inserção de genes ("open reading frames" - ORF) e um segmento menor, "fita B" de aproximadamente 2800 pares de base. São cinco as proteínas estruturais importantes no VDIB, VP1, VP2, VP3, VP4 e VP5. As proteínas principais do capsídeo viral são VP2 e VP3, que representam respectivamente, 51 e 40% do total de proteínas da VDIB. Estas contêm os principais epítopos neutralizantes desse vírus. VP2 expressa os epítopos soro-específicos, enquanto

VP3, apresenta epítopos grupo-específicos (VAN DEN BERG, 2000; MONTASSIER, 2001).

FIGURA 1: Estrutura e Organização do Genoma do VDIB



O VDIB é muito resistente às condições ambientais, e pode permanecer por 122 dias no galpão após a retirada de aves contaminadas e pelo menos 52 dias no alimento, água e fezes. Resiste a pH ácido e a temperaturas até 56° C. O vírus pode permanecer no ambiente por muito tempo mesmo após limpeza e desinfecção

São conhecidos dois sorotipos do VDIB: o sorotipo 2, isolado primariamente de perus, que é de baixa virulência tanto para perus quanto para galinhas, e não provoca lesões ou sintomatologia em galinhas; e o sorotipo 1, mais comum nos casos de doença em galinhas (LUKERT & SAIF, 1991; SIMON & ISHIZUKA, 2000).

Os VDIBs do sorotipo 1, baseados em estudos de neutralização cruzada, anticorpos monoclonais, ensaios biológicos e técnicas de biologia molecular, são genericamente classificados como cepas clássicas, variantes em antigenicidade e variantes em patogenicidade. As cepas clássicas incluem os isolados descritos antes da caracterização das variantes americanas (IKUTA, 2001). Provocam a doença sub-clínica quanto mais jovens forem as aves quando contaminadas - em geral menos que três semanas de idade - com maior grau de imunodepressão A infecção a partir da quarta semana de idade agrava o quadro clínico (LUKERT & SAIF, 1991; ROSALES, 1994).

As variantes antigênicas do sorotipo 1 foram encontradas nos EUA a partir de 1984-1985. Essas variantes antigênicas causavam intensa imunodepressão, mas não provocavam manifestação clínica da doença, independentemente da idade em que as aves eram afetadas. Ficou demonstrado que essas variantes tinham apenas

10-20% de relação com as cepas clássicas do vírus da DIB quando analisados através de testes de neutralização cruzada (LUKERT,1993a).

Em 1986, na Europa (Inglaterra, Holanda, Bélgica, Alemanha e França), na África do Sul e Israel, uma variante patogênica que causava mortalidade elevada (80-100%) foi reconhecida afetando as aves mesmo na presença de altos títulos de imunidade materna (KOUWENHOVEN, 1993;1994). No Brasil, desde 1997, surtos da doença, provocados por uma cepa virulenta de alta patogenicidade, similar às cepas virulentas européias, vêm aparecendo em todos os estados produtores de frangos de corte e em algumas regiões de criação intensiva de poedeiras comerciais (BERNARDINO, 2000; SOLIS, 2000; DI FÁBIO, 2002).

2.2.2. Sinais clínicos e lesões da DIB

A infecção clássica da DIB em galinhas é caracterizada por depressão, anorexia, diarréia mucóide, alta morbidade e mortalidade relativamente elevada. À necropsia são observadas: hemorragias intramusculares nas pernas, coxas e peito; lesões renais; aumento, edema e hemorragia na bolsa de Fabrício; lesões no trato digestivo, com hemorragias na junção moela e pró-ventrículo e hemorragia no intestino. Os órgãos mais afetados em ordem decrescentes por severidade e importância são: bolsa, baço, timo, tonsilas cecais e glândulas de Harder (LUKERT & SAIF, 1991; SIMON & ISHIZUKA, 2000).

As lesões histopatológicas mais severas ocorrem na bolsa. Um dia pósinfecção já há degeneração e necrose na área folicular. Hemorragias não são uma
constante mas podem ocorrer. À medida que a enfermidade evolui, o epitélio
corticomedular prolifera e cavidades císticas se desenvolvem na área medular dos
folículos. Todos os folículos são afetados 3 ou 4 dias pós-infecção. Necrose e
inflamação características aparecem durante 2 a 4 dias pós-infecção. As áreas
interfoliculares tornam-se proeminentes, devido à hipertrofia do tecido conectivo
(LUKERT & SAIF, 1991; LUKERT,1993a; SIMON & ISHIZUKA, 2000; BORDIN,
2001). Muitos trabalhos têm sido realizados avaliando a extensão e a gravidade das
lesões da DIB em frangos de corte provocadas por diferentes cepas de VDIB.
Algumas cepas do VDIB causam pequenas ou nenhuma inflamação na bolsa de
Fabrício, enquanto outras provocam intensa perda do estroma da bolsa e do micro-

ambiente folicular que suporta a diferenciação celular dos linfócitos B, o que explica a severa imunodepressão conseqüente da infecção (BOLIS et al, 2003; RAUTENSCHLEIN et al., 2003). Em seu estudo comparativo da imunopatogênese de cepas vacinais suaves, intermediaria e uma cepa virulenta do VDIB, Rautenschlein et al. (2003) não encontraram lesões microscópicas na bolsa provocadas por uma cepa suave vacinal; a cepa intermediária provocou destruição folicular acompanhada de lesões inflamatórias suaves com re-população folicular recomeçando entre 5 e 8 dias após a inoculação; e a cepa virulenta induziu lesões severas, detectáveis até o final do experimento, 29 dias após a inoculação. Huepe (1999) realizou um trabalho avaliando a caracterização do desenvolvimento normal da bolsa de Fabrício, timo e baço em frangos de corte comerciais. Todos esses dados têm sido importantes no diagnóstico das lesões e estudo da proteção conferida pelas vacina.

Os problemas mais comuns associados com a DIB clínica ou sua forma imunodepressora incluem problemas respiratórios por micoplasmas ou outros agentes incluindo vacinas contra bronquite infecciosa e doença de Newcastle; infecções bacterianas secundárias, causadas por E. coli, Staphylococcus aureus, Pasteurella multocida, Clostridium septicum; infecções parasitárias causadas por Eimeria sp e Cryptosporidium sp; e imunodepressão agravada quando associada a outras doenças imunodepressoras como Marek, anemia das galinhas e adenovirose (LUKERT & SAIF, 1991; ROSALES, 1999). No Brasil, conforme dados reunidos pelo Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária (CDPA) da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), a DIB continua sendo a principal virose diagnosticada, e uma análise mais detalhada desses diagnósticos mostra que esta enfermidade na maioria dos casos está associada a outras etiologias, principalmente às micotoxicoses, criptosporidioses, doença de Marek, bronquite infecciosa, coccidiose e, mais recentemente, à hepatite por corpúsculo de inclusão (RODRIGUES, 2002). A mesma observação feita no período de maio de 2001 a setembro de 2002 pelos laboratórios AHL Guelph e Kemptville no Canadá, mostrou que depleção linfóide na bolsa de Fabrício foi um achado frequente, e na maioria dos casos, acompanhada de outras doenças como coccidiose (geralmente cecal), enterite necrótica (Clostridium perfringens) e infecções bacterianas sistêmicas (geralmente Escherichia coli). Fragmentos de bolsa de Fabrício testados foram confirmados positivos para IBD através de técnicas moleculares de PCR e seqüenciamento genético (BINNINGTON et al, 2004).

2.2.3 Diagnóstico da DIB

O diagnóstico da DIB envolve a análise do histórico dos lotes, dos sinais clínicos e lesões. Nos casos agudos da doença o diagnóstico presuntivo é facilmente estabelecido pela observação de: alta morbidade, picos de mortalidade, rápida recuperação dos sinais clínicos, e das alterações macroscópicas da bolsa de Fabrício (tamanho e coloração) demonstrando severa inflamação e atrofia durante o curso da enfermidade. Como já descrito, as aves com menos de três semanas não manifestam sinais da doença, assim como aquelas acometidas de algumas cepas variantes americanas ou aves jovens com anticorpos maternos. Nesses casos a doença é subclínica na maioria das vezes. O diagnóstico deve ser baseado então em estudos histopatológicos, sorológicos como a soroneutralização (SN) e o ELISA, e/ou pela identificação viral (LUKERT & SAIF, 1991; LUKERT,1993b; BUTCHER & MILES, 2003).

A avaliação das alterações macroscópicas e histológicas de atrofia na bolsa de Fabrício, em aves jovens ou aves com anticorpos maternos, pode ser fundamental na detecção da forma imunossupressora da doença (LUKERT & SAIF, 1991). A histopatologia foi o exame de eleição para evidenciar os efeitos dos vírus vacinais ou de campo, até o momento em que foram introduzidas as vacinas fortes contra a DIB. Estas vacinas provocam lesões até três semanas pós-aplicação que podem ser confundidas com as provocadas pelo vírus de campo. A criação de escores ajuda a avaliar o grau severidade das lesões e a compatibilidade dessas com a ação dos vírus vacinais e de campo. Resultados de depleção linfóide sem alteração na sorologia no final do lote podem indicar outros fatores imunodepressores como micotoxicose, estresse, anemia, doença de Marek, para citar alguns (BOLIS et al., 2003; BERNARDINO, 2004). A histopatologia de outros órgãos como timo, baço, fígado, rins, pode ser útil no diagnóstico diferencial, principalmente no caso de adenovirose, bronquite e anemia infecciosa. As modificações na bolsa de Fabrício provocadas pelo vírus da doença de Marek são marcadamente diferentes das provocadas pelo VDIB (LUKERT & SAIF, 1991).

Na detecção de anticorpos contra a DIB, o ELISA tem as vantagens de ser uma prova rápida, com resultados facilmente interpretados por sistemas de computador, que permitem o armazenamento das análises, para avaliação da performance sorológica de lotes de reprodutores e de sua progênie. Esses estudos orientam a elaboração de melhores esquemas de vacinação (LUKERT & SAIF, 1991; DE HERDT et al., 2000; KNOBLICH et al., 2000). O trabalho realizado por De Herdt (2000) mostrou uma correlação favorável entre altos títulos de anticorpos e/ou baixa variância nos anticorpos contra DIB em lotes de matrizes pesadas e a boa performance e redução das taxas de condenação em frangos de corte, filhos dessas matrizes. Muitos estudos têm sido realizados avaliando a especificidade e sensibilidade das variadas marcas e tipos de "kits" comerciais de ELISA para IBD. Os resultados comprovam a eficiência da prova na detecção de anticorpos contra a DIB e concordam que o uso da proteína VP2 como antígeno impregnado na placa aumenta a especificidade do teste (JACKWOOD et al., 1999; SAYD, 1999; SALAS et al., 2002; TESSARI et al., 2003).

A identificação do VDIB pode ser realizada pelo isolamento viral seguida de imunofluorescência e microscopia eletrônica (LUKERT & SAIF, 1991). Atualmente são utilizados métodos baseados na análise de ácidos nucléicos como ferramentas na detecção e subtipagem de vírus da DIB, sem a necessidade de isolamento ou propagação em cultivo celular (DORMITÓRIO et al., 1997; JACKWOOD & JACKWOOD, 1997; IKUTA et al., 2002). Existem diferentes formas de identificar as cepas de vírus da DIB através da biologia molecular, mas todas as metodologias concordam que a análise da região variável do antígeno VP2 é o alvo indicado para discriminação dos diferentes VDIBs (IKUTA et al., 2002). Técnicas como a desenvolvida por Jackwood e Jackwood (1994) utilizando a Transcrição Reversa seguida da Reação em Cadeia de Polimerase ou "Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction" (RT/PCR), acoplada à digestão com enzimas de restrição, permitiu a diferenciação de variantes antigênicas e patogênicas (IKUTA et al, 2002). A partir destes trabalhos a identificação e a caracterização de cepas do VDIB tem sido realizada em todo o mundo através destas técnicas (JACKWOOD & NIELSEN, 1997; CHEN et al., 1998; ZAYAS et al., 1999; LOJKIC' et al., 2003; MAJÓ et al., 2002; BANDA et al, 2003; PHONG et al., 2003).

2.2.4 Prevenção e Controle da DIB

O controle da DIB só pode ser realizado pela associação da intensa aplicação de medidas de biossegurança ao uso de vacinas. As medidas de biossegurança indicadas no controle da DIB incluem todas aquelas medidas gerais de promoção da saúde, prevenção de doenças, monitoramento e pronto atendimento profilático (SIMON & ISHIZUKA, 2000).

A utilização de vacinas contra a DIB é um trabalho complexo. A imunização de reprodutoras é especialmente importante para a transmissão adequada de proteção à progênie por até 5 semanas, dependendo da eficiência do programa. E a imunidade ativa pela vacinação garante a proteção por toda a vida do frango. Entretanto existe grande interferência dos anticorpos maternos (AcM) na eficiência da resposta vacinal. Vacinas suaves, intermediárias e fortes só ultrapassam títulos de AcM mensurados através da SN de 1: 100. 1:250, e 1: 500, respectivamente (KREAGER, 1994; LUKERT, 1994). Em frangos de corte o melhor período de vacinação vai depender dos títulos de imunidade materna, da via de aplicação e da virulência da cepa vacinal. Não existe um programa padrão a ser recomendado para controle da DIB, mas é sabido que se deve vacinar os frangos mais de uma vez para melhorar a cobertura vacinal dentro dos lotes e aumentar a possibilidade de que a vacinação não sofra a interferência dos AcM (CARDOSO & PEREIRA, 2001; BERNARDINO, 2001; GARDIN & CAMILO, 2001; BOLIS, 2001; AHMED et al., 2003).

De um modo geral as vacinas intermediárias tem obtido bons resultados no controle da DIB. Mas a partir de 1997 no Brasil, com os surtos de DIB Virulenta, o uso de vacinas fortes foi bastante aumentado. Rautenschlein et al. (2003) observaram que algumas cepas intermediárias causam lesões na bolsa de Fabrício, provocando algum grau de interferência na resposta imune das aves, enquanto cepas suaves provocaram lesões discretas sem sinais de inflamação ou não provocaram lesões. Entretanto as cepas suaves obtiveram menor grau de proteção frente ao desafio que a cepa intermediária. Tsukamoto et al. (1995) realizaram estudo avaliando a eficiência de duas vacinas suaves e uma intermediária frente à cepa Ehime/91 do VDIB muito virulento encontrada no Japão. Bolis et al. (2003) realizaram estudo semelhante da eficácia de cepa forte vacinal e cepa intermediária

"plus", frente ao VDIB muito virulento em pintos de corte criados em isoladores. Em ambos os experimentos foram utilizados os parâmetros de peso da ave, peso da bursa, tamanho da bursa, sorologia e histopatologia para avaliar o desempenho das vacinas e sua capacidade de proteção.

O monitoramento dos programas de vacinação contra DIB pode ser realizado através do estudo da bolsa de Fabrício pelo seu aspecto macroscópico e microscópico. O uso do "bursômetro" (Anexo 10.1) é orientado como forma de medir o diâmetro do órgão e avaliar possíveis alterações no tamanho, compatíveis com ação de vírus vacinal ou de campo (BERNARDINO, 2004). A histopatologia auxilia na observação de lesões microscópicas provocadas pelos efeitos desses vírus. Através da observação da severidade das lesões é possível diferenciar o tipo de infecção e possíveis falhas na proteção (BOLIS, 2003; BERNARDINO, 2004)

A sorologia pode ser utilizada como monitoramento de desafio no campo. Os testes de ELISA e SN podem indicar se um lote sofreu ou não um desafio, já que os vírus de campo induzem títulos extremamente altos e as vacinas intermediárias não induzem a formação de altos títulos. Quanto mais forte a cepa vacinal, maior podem ser os títulos encontrados. Nos lotes em idade de abate, a sorologia pode evidenciar se houve desafio médio, baixo ou alto, dependendo dos valores encontrados, mas é importante não confundir desafio com doença, pois é possível encontrar aves bem protegidas, com altos títulos de anticorpos indicando desafio, mas não manifestando sinais de doença. A sorologia em conjunto com outros exames, como a histopatologia pode ajudar a compreender a performance do lote (BERNARDINO, 2004; BOLIS et al, 2003).

2.3 Enfermidades Favorecidas pela DIB e Conseqüentes Perdas em Frangos de Corte

A DIB está classificada na lista B da OIE (Office International des Epizooties), o que significa que é considerada uma enfermidade transmissível, importante do ponto de vista sócio-econômico e/ou sanitário a nível nacional, e internacional, no comércio de animais e produtos de origem animal (OIE, 2002).

Apesar do incremento de medidas sanitárias, do uso de vacinas vivas, e dos avanços nos procedimentos de diagnóstico, a DIB continua sendo uma das causas

mais importantes de imunodepressão em muitas áreas de produção avícola em todo o mundo. A imunodepressão favorece o aparecimento de outras enfermidades que levam a manifestação de problemas respiratórios, problemas de pele, crescimento ruim, e desuniformidade, responsáveis por grandes perdas por condenação no processamento da carne avícola (ROSALES, 1999; RODRIGUES, 2002).

A legislação brasileira, que regulamenta o abate e a inspeção sanitária de produtos de origem animal, determina rejeição total das aves que no exame "ante" ou "post mortem" apresentem enfermidades como coccidiose, endo e ecto parasitoses acompanhadas de magreza, lesões supuradas ou abcessos, aerossaculite e outros processos inflamatórios septicêmicos, entre outras causas. Lesões no coxim plantar podem ocasionar a condenação das patas (BRASIL, 2001; 2003).

A importância econômica da DIB é traduzida pelas perdas com mortalidade nos casos agudos, e nos lotes atingidos pela imunodepressão, por desempenho produtivo alterado (conversão alimentar ruim, baixo ganho de peso, desuniformidade nas aves); suscetibilidade a outras infecções, resposta vacinal prejudicada e aumento na necessidade de tratamentos com antibióticos.

A primeira descrição do efeito imunossupressor do VDIB em galinhas foi publicada por Faragher et al. (1974), que demonstraram a redução na resposta sorológica à vacinação contra a doença de Newcastle. Hirai et al. (1974) demonstrou a redução na resposta humoral para outras vacinas também.

Pintos infectados precocemente com o VDIB foram mais suscetíveis a outras enfermidades como coccidiose (ANDERSON et al., 1977), doença de Marek (CHO, 1970; SHARMA, 1984), anemia hemorrágica-aplástica e dermatite gangrenosa (ROSENBERGER et al., 1979), laringotraqueíte (ROSENBERGER & GELB., 1978), bronquite infecciosa (PEJKOVSKI et al., 1979), anemia infecciosa (YUASA et al., 1980), salmonelose e colibacilose (WEYETH, 1975). Pintos infectados com VDIB e reovirus manifestaram mais problemas de patas que aqueles sem infecção pelo VDIB (SPRINGER et al, 1982).

O reflexo desse efeito imunossupressor do VDIB é verificado no matadouro, onde as perdas são aumentadas pela elevação nas taxas de condenação por caquexia, aerossaculite, septicemia-toxemia e doenças de pele como celulite,

dermatites diversas e outras afecções (EFALDIL et al, 1996a; 1996b; ROSALES, 1999; FALLAVENA, 2001).

Farooq et al. (2003) estudaram em lotes de frangos a prevalência e as perdas econômicas provocadas pela DIB associadas a fatores como estação do ano, tipo de galpão, condições higiênicas e presença de coccidiose. Nesse estudo, frangos acometidos pela DIB em idade maior que 35 dias tiveram perdas mais significativas que os que adoeceram entre 19 e 23 dias. A estação do ano também demonstrou diferenças na indução da DIB, com perdas maiores no inverno. A associação da DIB com coccidiose foi significativamente prejudicial ao desempenho dos lotes.

Alguns países, através de seus órgãos oficiais realizam estudos avaliando o risco de transmissão do VDIB para a avicultura local a partir da importação de carne de frangos e produtos derivados (NOVA ZELÂNDIA, 2001).

EUA, UE, Japão e outros países mantêm mecanismos que dificultam a entrada de produtos brasileiros em seus mercados. Não apenas através de barreiras tarifárias, mas também instrumentos defensivos e barreiras não tarifárias, incluindo barreiras sanitárias (MDIC, 2004; IPARDES, 2002). Nesse contexto as implicações da DIB como o favorecimento às infecções bacterianas concomitantes, o aumento da necessidade do uso de antibióticos e a ineficácia dos programas vacinais prejudicando o controle sanitário, podem interferir na imagem do produto brasileiro.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado através de um estudo epidemiológico transversal (MARTIN et al., 1989), onde foram investigados 130 (cento e trinta) frangos de corte, provenientes de várias unidades de criação da mesma empresa avícola, com plantel de cerca de 550.000 frangos por mês, na região de São José do Vale do Rio Preto – RJ, no período de junho a outubro de 2003. O número de aves (n), tomado para amostra, foi calculado tomando-se como base uma prevalência (p) de 10%, usando um intervalo de confiança (z) de 95%, e um erro amostral (e) de 5% (MARTIN et al., 1989)., utilizando-se a fórmula:

$$n = \underline{z^2 \cdot p(1-p)},$$

Treze coletas foram realizadas com intervalos de no mínimo 7 dias e no máximo 14 dias de acordo com a conveniência da empresa, sempre no dia da saída dos lotes. A empresa avícola fornecedora comercializa por semana em torno de 15 caminhões com 8.000 aves. A cada coleta, uma caixa de 10 frangos do mesmo lote (Figura 2) foi retirada do caminhão de transporte das aves ao matadouro (Figura 3), selecionado por sorteio. Todos os frangos foram criados em condições zootécnicas e nutricionais idênticas. As aves foram submetidas a um programa sanitário único, incluindo duas vacinações no 6º e 17º dia de idade, contra doença de Newcastle (cepa B1) e DIB (cepa intermediária) simultaneamente.



FIGURA 2: Caixa de transporte com capacidade para 10 frangos de corte



FIGURA 3: Caminhões de transporte de frangos de corte ao matadouro

3.1 COLETA DE MATERIAL

As aves foram levadas à Área de Anatomia Patológica, no Laboratório de Biologia Animal (LBA) da PESAGRO – RIO (**FIGURA 4**), onde foram realizados os seguintes procedimentos:

3.1.1 Coleta de sangue das aves

As amostras de sangue dos frangos foram coletadas por punção na veia braquial (**Figura 5**) com agulhas e seringas descartáveis, em volume de aproximadamente 3 mL. Estas foram acondicionadas em frascos estéreis de vidro, para dessorar. Os soros obtidos foram armazenados em freezer a –70° C até a realização dos testes sorológicos.



FIGURA 4: Área de anatomia patológica do LBA da PESAGRO-RIO



FIGURA 5: Coleta de sangue na veia braquial de frango de corte

3.1.2 Pesagem das aves

Após a coleta de sangue, as aves foram pesadas individualmente, em balança suspensa graduada, com 250g de intervalo, de uso doméstico (Figura 6). Os pesos obtidos foram registrados na ficha de coleta (Apêndice 9.1) e as aves classificadas em três faixas de peso estabelecidas a partir do peso médio (TABELA 1): a faixa central com 250g em torno do peso médio de 2000g, com pesos de 1750g

a 2250g; a faixa de peso mais baixa, de 1500 até o peso mínimo (1000g); e a faixa mais pesada de 2500 até o peso máximo (3000g) (**TABELA 5**).



FIGURA 6: Pesagem de frango de corte em balança suspensa.

3.1.3 Necrópsia

Depois de pesadas, as aves foram examinadas e seu aspecto geral avaliado e registrado em fichas de coleta (**Apêndice 9.1**).

Todas aves foram sacrificadas pelo método de desarticulação atlanto-occipital e a necrópsia foi realizada pela técnica usual, com a ave em decúbito dorsal, desarticulação coxofemoral e rebatimento da pele sobre o peito. Todos os órgãos foram observados detalhadamente, com registro nas fichas de coleta (**Apêndice 9.1**) das informações por ave, das lesões macroscópicas detectadas, e da presença de parasitas internos e externos. Enfermidades como coccidiose, aerossaculite, lesões na cabeça do fêmur, verminose, hemorragias na ponta da asa e lesões no coxim plantar foram listadas por ave a medida em que eram observadas.

A partir da necrópsia, pela observação das lesões macroscópicas na mucosa do intestino delgado e cecos dos frangos de corte foi realizado o diagnóstico presuntivo da coccidiose nos frangos em estudo. O diagnóstico etiológico foi realizado por técnicas laboratoriais. O raspado de mucosa foi coletado para exame

microscópico direto e fragmentos de intestino em solução de formalina a 10%, para histopatologia, processados em conjunto com as bolsas de Fabrício.

O exame direto do raspado intestinal (MARTINS et al, 1982) foi realizado pelo seguinte processo:

- a. Duas gotas de água destilada foram colocadas em uma lâmina de vidro;
- b. Uma pequena quantidade de fezes do fragmento de intestino foi misturada com a água na lâmina;
- c. Cobriu-se com lamínula e foi realizado o exame ao microscópio óptico em menor e médio aumento para observação de oocistos de *Eimeria* sp.

No registro de análises ficou convencionado que as aves sem coccidiose seriam representadas pelo número um (1) e as aves com diagnóstico positivo para coccidiose, pelo número dois (2).

3.1.4 Coleta, medição e pesagem da bolsa de Fabrício

Durante a necrópsia, as bolsas de Fabrício foram extraídas, medidas em bursômetro (**Anexo 10.1 e 10.2**) e pesadas, em balança analítica digital (Mettler-AE200). Os tamanhos das bolsas de Fabrício foram registrados de acordo com a escala do bursômetro de 1 a 8. E os pesos foram divididos em três faixas com a faixa central obtida pelo intervalo de 0,4g (meio desvio padrão) para mais e para menos, a partir do peso médio do total de bolsas de 1,2 g (**TABELA 1**). Foram obtidas as faixas entre 0, 9 e 1,6 g como faixa central; igual ou abaixo de 0,8 g até o peso mínimo (0,4 g) e igual ou acima de 1,7 g até o peso máximo (4,5g).

As bolsas foram divididas e metade acondicionada em frasco plástico contendo 20 mL solução de formalina a 10%, e a outra metade em recipiente estéril, imediatamente submetida à refrigeração. Foram calculados os índices PB/PC (peso da bolsa / peso corporal da ave X 1000) e PB/TB (peso da bolsa / tamanho da bolsa) (HUEPE, 1999; BOLIS et al., 2003).

3.2 EXAME HISTOPATOLÓGICO DAS BOLSAS DE FABRÍCIO

No Laboratório de Anatomia Patológica da Faculdade de Veterinária da UFF, as amostras de bolsa de Fabrício coletadas em solução de formalina a 10% foram

clivadas e processadas segundo as técnicas histológicas usuais, incluídas em parafina, cortadas em micrótomo, montadas em lâminas de vidro, coradas pela técnica da hematoxilina e eosina (HE) (LUNA, 1968) e examinadas ao microscópio óptico para detecção ou não de lesões compatíveis com a DIB (ASDRUBALI, G.et al., 1974; ROSALES, 1989; LUKERT E SAIF, 1991; BORDIN, 2001). Foi criado um escore de lesões para classificar os achados microscópicos, a saber:

Escore 0 = sem lesões (**Apêndice 9.2**);

Escore 1 = discretas lesões, leve hiperplasia, discreta rarefação linfóide folicular ;

Escore 2 = sinais de inflamação, edema, atrofia de folículos, rarefação linfóide, degeneração e necrose folicular;

Escore 3 = atrofia severa, múltiplos cistos foliculares e epiteliais, destruição folicular, necrose, fibrose

3.3 ELISA

Os soros coletados foram acondicionados em tubos plásticos para microcentrífuga ("eppendorfs") com capacidade para 1,5 mL e remetidos sob refrigeração para o centro de pesquisa do Laboratório Biovet S/A, onde se realizou a prova sorológica. Foi utilizado o "kit" comercial de ELISA "Flock Chek" (IDEXX Laboratories, Inc., USA), para DIB, conforme as instruções do fabricante:

3.3.1 Reagentes

- a. Microplacas revestidas com antígeno DIB com 96 cavidades;
- b. Controle positivo DIB, Anti-DIB de galinha, diluído, preservado com azida sódica:
- c. Controle negativo, soro de galinha diluído não reativo para anti-DIB, preservado com azida sódica;
- d. Conjugado de peroxidase de raiz forte (HRPO), soro de cabra anti-galinha preservado com gentamicina;
- e. Diluente de amostra tamponado preservado com azida sódica;

- f. Substrato TMB;
- g. Solução de interrupção.

3.3.2. Preparo das amostras

As amostras de soro para teste foram diluídas em proporção 1:500 com Diluente de Amostra (1µL de soro para 500µL de Diluente de Amostra). Os soros controles não foram diluídos. Foi utilizada uma ponteira para cada amostra e as amostras foram totalmente homogeneizadas antes da distribuição nas microplacas revestidas.

3.3.3 Procedimento de teste

- a. Todos os reagentes ficaram fora de refrigeração até alcançarem a temperatura ambiente (20° a 27°C) e então foram homogeneizados suavemente por inversão e movimentos circulares;
- A placa revestida de antígeno foi organizada, com as posições das amostras por cavidade registradas por escrito;
- c. 100 μL de Controle negativo não diluído foi distribuído nas cavidades A1 e
 A2 da placa revestida;
- d. 100µL de Controle positivo não diluído foi distribuído nas cavidades A3 e
 A4 da placa revestida:
- e. 100 μL de amostra diluída foi distribuída nas cavidades previamente marcadas;
- f. A placa foi incubada por 30 minutos a temperatura ambiente;
- g. O conteúdo líquido das cavidades foi aspirado com pipeta e desprezado em reservatório apropriado;
- h. Cada cavidade foi lavada com aproximadamente 350 μL de água deionizada ou destilada, por três a cinco vezes e depois o liquido foi completamente aspirado e desprezado;
- i. 100µL do conjugado HRPO foi distribuído nas cavidades;
- j. As placas foram incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente;
- k. Os passos q e h foram repetidos;

- I. 100µL de solução de substrato TMB foi distribuído em cada cavidade;
- m. A placa foi incubada por 15 minutos a temperatura ambiente;
- n. 100μL da solução de interrupção foi distribuída em cada cavidade para parar a reação;
- A leitora foi zerada com ar e o resultado medido registrando os valores de absorbância a 650nm - A (650).

3.3.4 Validação do teste

Para o ensaio ser válido, a diferença entre a média do controle positivo e a média do controle negativo (PCx - NCx, **Anexo 10.3**) teve que ser maior que 0,075. A absorbância média do Controle Negativo foi menor ou igual a 0,150. A presença ou ausência de anticorpos contra a DIB foi determinada pela relação do valor A(650) da amostra com a média do controle positivo. O controle positivo, padronizado, representa níveis significantes de anticorpos contra a DIB em soro de galinha. O nível relativo de anticorpo da amostra não conhecido foi determinado pelo cálculo do coeficiente de absorbância da amostra pelo controle positivo (S/P). Os títulos finais relacionaram S/P em uma diluição 1:500 e foram calculados através do programa fornecido pelo fabricante, pela fórmula:

$$Log_{10}^{\text{título}} = 1,09 \text{ x } (Log_{10}^{\text{S/P}}) + 3,36$$

Amostras com coeficiente S/P menor ou igual a 0,2 foram consideradas negativas. Coeficientes maiores que 0,2 (título maior que 396) foram considerados positivos e indicaram exposição ao vírus da DIB.

3.4 IDENTIFICAÇÃO DO VÍRUS DA DIB POR RT/PCR

A RT/PCR foi realizada no Laboratório de Epidemiologia Molecular da Faculdade de Veterinária da UFF, com apoio do Centro de Pesquisa do Laboratório Biovet S/A.

As bolsas acondicionadas sob refrigeração foram maceradas em PBS, pH 7,4 (**Anexo 10.4.8**), com gral e pistilo e estocadas em glicerol congeladas até a realização da RT/PCR. Essas bolsas, em PBS e glicerol, foram reunidas em 13 "pools" de 10 bolsas por dia de coleta, constituindo as amostras identificadas de 1 a

13, para RT/PCR. De cada uma das 13 amostras, um volume de 1mL foi retirado e enviado para confirmação do RT/PCR pelo Laboratório de Virologia Comparada do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

3.4.1 Extração do RNA

Foram utilizados 200μL de cada amostra homogeneizada em 200μL de TNE, e extraída uma vez, em igual volume de clorofórmio (400μL). As amostras foram centrifugadas por 8 minutos a 13.500 rpm a 10° C e retirado o sobrenadante em um volume de aproximadamente 300 μL. Em seguida foram adicionados a Proteinase K(20mg/mL) no volume de 15μL e Dodecil Sulfato de Sódio 20% (SDS) no volume de 7,5μL para cada amostra. A solução foi homogeneizada e levada ao banho seco a 37° C por uma hora. A seguir, a purificação do RNA viral foi realizada pelo método fenol : clorofórmio, adaptado de SAMBROOK et al. (1989), com uma etapa de utilização do fenol seguida de uma etapa de fenol : clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1). As amostras foram precipitadas em 900μL de etanol, levadas ao freezer – 70° C por 40 minutos. Lavadas em álcool 70°, centrifugadas a 13500rpm por 10 minutos a 10° C. O álcool foi retirado com bomba de vácuo e as amostras levadas para secar em banho seco a 37° por 30 minutos. O RNA foi ressuspendido em 35μL de Tris 10mM pH 7 adicionado de 0,5μL de inibidor de RNAse (RNA guard, Pharmacia) e levado ao banho de gelo.

3.4.2 Primers

Foram utilizados os seguintes "primers" específicos para as seqüências da região variável do VP2 (KIBENGE et al., 1990; JACKWOOD &SOMMER, 1998):

5'-GGC CCA GAG TCT ACA CCA TAA CTG-3'
5- CCC GGA TTA TGT CTT TGA AGC C -3'

3.4.3 RT/PCR

3.4.3.1 Desnaturação

Para cada amostra foram utilizados 2µL de RNA viral após a extração, 0,5µL de cada primer, 4µL de água Milli-Q, incubados a 90° C por 3 minutos e depois levadas ao banho de gelo pelo tempo de preparo do mix de reagentes da RT.

3.4.3.2 RT

O mix da reação foi preparado com: 6,4µL de água Milli-Q; 4µL de Tampão 5X; 2µL de dNTPmix 10mM; 0,5µL de inibidor de RNAse 20U/µL (RNA guard, Pharmacia Biotech, Suécia); 0,1µL de enzima M-MLV 200U/µL (USB Co., EUA). Foram adicionados 7µL de amostra ao mix e incubado a 37° C por uma hora para obtenção da síntese da primeira fita de cDNA. Em seguida a reação foi parada pela desnaturação da enzima a 95° C por 5 minutos.

3.4.3.3 PCR

A amplificação foi realizada pela técnica de PCR e a reação foi realizada com 21,8μL de água Milli-Q; 5μL de amostra de cDNA obtido na RT; 3μL de dNTPmix 10mM; 3μL de tampão 10X; 0,9μL de MgCl₂ (50mM); 0,5μL de cada primer; 0,3μL de Taq polimerase, em termociclador PTC-100 (PELTIER – EFFECT CYCLING – ML Research, Inc) por 95° C por 3 minutos (desnaturação); 40 ciclos de 94° C por 30 segundos, 52° C por 30 segundos, 72° C por 1 minuto; e etapa final de 72° C por 5 minutos.

Após a amplificação, as amostras foram corridas por eletroforese (Life Technologies/ Gibco BRL Electrophoresis Power Supply. Model, 250) em gel de agarose 2% (Anexo 10.4.5) corado com brometo de etídeo (Anexo 10.4.7) e visualizadas em transiluminador (EB-20E- Ultra-Lum, Inc. Carson, Califórnia) com luz ultravioleta (U.V.). As amostras positivas na detecção por RT/PCR foram digeridas com as enzimas de restrição, Mval e Mbol (Amersham Bioscience, Inglaterra), de acordo com as instruções de cada fabricante, os fragmentos digeridos foram corridos

por eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo e visualizado em transiluminador U.V.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise de Regressão Linear, as variáveis foram selecionadas, de acordo com a modalidade de estudo transversal realizado, em variável dependente, ou seja aquela que será a conseqüência a ser explicada e as variáveis independentes, ou variáveis preditivas, utilizados para explicar o comportamento da variável dependente (MARTIN et al, 1989). Em uma etapa da análise o peso das aves (PESO) foi utilizado como a variável dependente frente às seguintes preditivas ou explicativas: índices peso da bolsa : peso corporal (PB/PC) e peso da bolsa / tamanho da bolsa (PB/TB); tamanho da bolsa (TB); peso da bolsa (PB); presença ou ausência de coccidiose (COCCI); coeficiente S/P de absorbância no ELISA (ELISA); e os escores de lesões microscópicas encontradas na bolsa de Fabrício (ESCORE). COCCI entrou na análise de Regressão por ter sido a única enfermidade cuja etiologia foi determinada por exame direto e histopatologia. A presença de coccidiose observada à necrópsia foi identificada pelo número 2 e a ausência pelo número 1, para que pudessem ser analisadas. Na segunda etapa de Regressão Linear PB foi a variável dependente frente a TB. E na última etapa de regressão Linear ESCORE foi usado como variável dependente frente aos índices PB/TB e PB/PC como variáveis preditivas.

Para analisar ESCORE em relação a COCCI foram utilizados os testes de Análise Variância (ANOVA) e teste de Tukey-Kramer (MARTIN et al., 1989).

Para analisar variáveis não paramétricas, foi usado o teste de Qui-quadrado Kruskal-Wallis na análise da proporção das enfermidades encontradas à necrópsia em relação ao peso das aves ou em relação ao escore de lesão microscópica, encontrado na histopatologia (MARTIN et al, 1989).

4 RESULTADOS

4.1 PESAGEM DAS AVES, NECRÓPSIA, MEDIÇÃO E PESAGEM DAS BOLSAS DE FABRÍCIO

O peso médio obtido dos 130 frangos estudados foi 2037g, com um desvio padrão de aproximadamente 450g (TABELA 1). Assim foram encontrados: 21 frangos na faixa de peso entre 1000g e 1500g; 80 frangos na faixa entre 1750g e 2250g; e 29 frangos na faixa mais pesada entre 2500g e 3000g (TABELA 5). Esses pesos foram analisados em relação aos resultados obtidos para as demais variáveis (TABELA 2).

À necrópsia foram encontradas diversas enfermidades que comprometiam a qualidade do frango de corte ao abate. As observações mais freqüentes e que levam à condenação de acordo com o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) foram: 74 casos de coccidiose, 58 de aerossaculite; 38 de lesões na cabeça do fêmur; de pericardite; 17 de verminose, 11 de hemorragias na ponta da asa; e 8 de lesões no coxim plantar (**Tabelas 4 e 5**).

Das 74 aves suspeitas de coccidiose através da observação das lesões macroscópicas no intestino, todas foram confirmadas pelos exames direto e histopatológico (Figura 7).

39

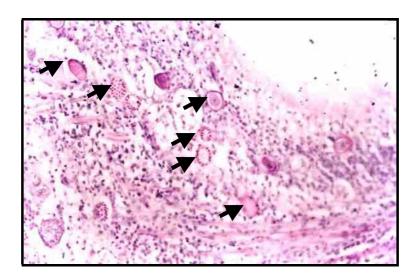
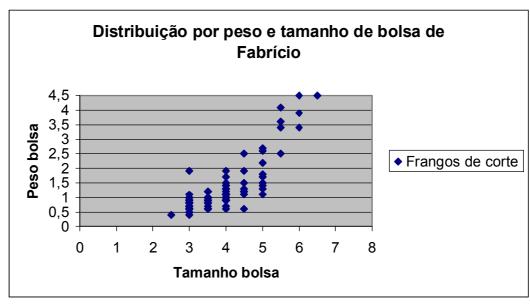


FIGURA 7: Frango de corte. Intestino delgado. Presença de formas de evolução de *Eimeria sp.*HE. 100X.

As bolsas de Fabrício coletadas e mensuradas obtiveram os seguintes dados para tamanho no bursômetro: 44 frangos de bolsas tamanho 3; 61, tamanho 4; 17, tamanho 5; sete, tamanho 6 e uma ave tamanho 7. Para peso das bolsas foram obtidas as seguintes observações: 45 aves com bolsas entre 0,4 e 0,8 g; 67 bolsas entre 0,9 e 1,6g; e 18 bolsas com pesos entre 1,7 e 4,5g (Figura 8). A partir dos dados individuais foram calculados os índices PB/PC e PB/TB e analisados em relação aos escores de lesão na bolsa obtidos pela observação histopatológica (TABELA 3).



Regressão simples, p<0,05

FIGURA 8: Dispersão por peso e tamanho da bolsa de Fabrício dos frangos de corte estudados.

4.2 EXAME HISTOPATOLÓGICO

Todos os 130 frangos de corte analisados em idade de abate, apresentaram lesões microscópicas na bolsa de Fabrício em maior ou menor grau de severidade (TABELA 6) a saber: severas lesões (escore 3) com intensa destruição folicular, formação de cistos foliculares e epiteliais, necrose e fibrose na bolsa de Fabrício (FIGURAS 11,12,13) foram observadas em 58 frangos; edema, depleção linfóide com atrofia folicular (escore 2, FIGURA 10) observadas em 48 aves; e 24 aves apresentaram discreta depleção linfocitária na bolsa, mas mantiveram a arquitetura do folículo (escore 1, FIGURA 9).

A severidade das lesões observadas na bolsa de Fabrício de frangos de corte favoreceu a presença de coccidose (TABELA 6) e ambos os agravos influenciaram negativamente o peso corporal dessas aves (TABELA 2).

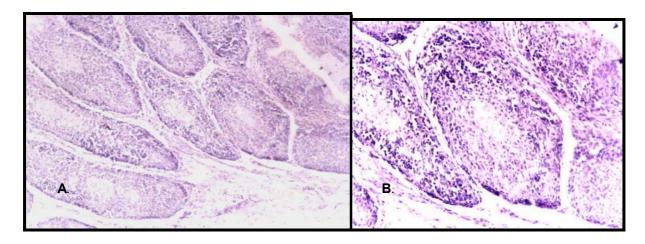


FIGURA 9: A. Frango de corte. Bolsa de Fabrício. Discreta rarefação linfocitária cortical folicular, arquitetura do folículo preservada, **escore 1**. HE.100X. **B.** Aumento maior. HE.200X.

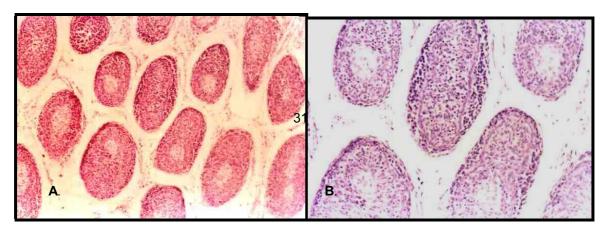


FIGURA 10: A. Frango de corte. Bolsa de Fabrício. Edema, atrofia severa de folículos, rarefação linfóide, **escore 2** de lesões na bolsa. HE.40X. **B**. Aumento maior.HE.200X

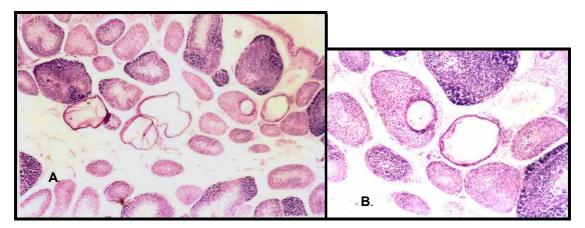


FIGURA 11: A. Frango de corte. Bolsa de Fabrício. Edema, atrofia severa dos folículos, destruição total dos folículos com presença de cistos de diâmetros variados, necrose e fibrose, **escore 3**.HE. 40X. **B.** Aumento maior.100X.

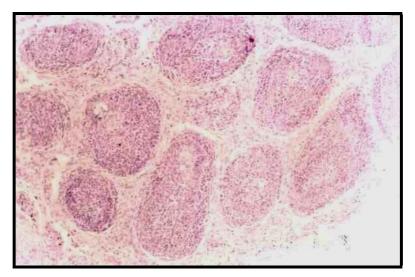


FIGURA 12: Frango de corte. Bolsa de Fabrício. Atrofia e necrose dos folículos com intensa destruição folicular, perda da demarcação dos limites foliculares, fibrose e infiltrado leucocitário intersticial, **escore 3**.HE.100X

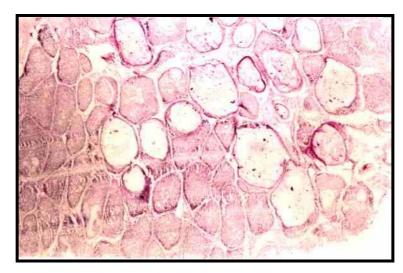


FIGURA 13: Frango de corte. Bolsa de Fabrício. Atrofia severa com depleção linfóide e presença de cistos na maioria dos folículos, **escore 3**.HE.40X.

4.3 ELISA

Dos 130 soros analisados através de ELISA, 127 (97,7%) apresentaram resultados positivos (coeficiente de absorbância S/P >0,2), confirmando a presença de anticorpos contra a DIB na maioria dos frangos de corte na saída para o abate (FIGURA 14).

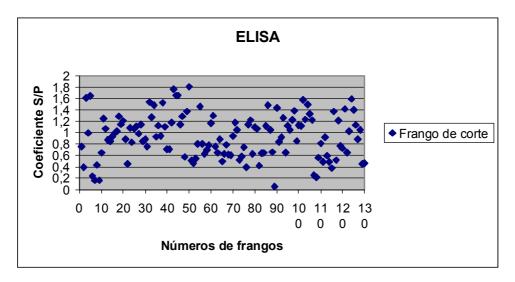


FIGURA 14: Dispersão por coeficiente S/P ao ELISA nos 130 frangos de corte investigados ao abate

4.4 RT/PCR

Dos 13 "pools" de amostras, submetidos à identificação viral pela RT/PCR, seis (6) foram positivos para VDIB com padrões compatíveis com amostra de campo pela técnica de corte por enzimas de restrição, confirmando a presença de infecção. Três foram positivos à PCR mas não foi possível diferenciar a amostra viral; e 4 foram negativos.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as variáveis estudadas foram descritas para análise e tiveram suas médias, desvios padrões, mediana, valores mínimos e máximos e coeficientes de variações calculados. O peso das aves obteve como média 2037g e a mediana 2000g, valores tão próximos demonstraram que a distribuição do peso seguiu a curva Normal. A mesma observação pode ser feita para os índices PB/PC e PB/TB e para as variáveis TB, PB e ESCORE. A média para COCCI foi acima de 1,5, o que indicou que a maioria das aves apresentava coccidiose (**Tabela 1**).

TABELA 1: VALORES DESCRITIVOS DAS VARIÁVEIS ESTUDADAS

	VALORES DESCRITIVOS DAS VARIÁVEIS EM ESTUDO								
Variáveis	PB/PC	ТВ	РВ	PB/TB	COCCI*	ELISA	ESCORE	PESO	
Casos	130	130	130	130	130	130	130	130	
Média	0, 586	3,915	1,178	0,286	1,569	0,937	2,262	2037	
SD	0,372	0,863	0,785	0,119	0,497	0,381	0,753	448	
EP	0,327	0,076	0,069	0,010	0,044	0,033	0,066	39,29	
CV	63,53	22,04	66,69	41,46	31,68	40,62	33,29	22,00	
Mediana	0,457	4,000	1,000	0,255	2,00	0,928	2,00	2000	
Mínimo	0,229	3,00	0,400	0,120	1,00	0,050	1,00	1000	
Maximo	2,290	7,00	4,500	0,750	2,00	1,806	3,00	3000	

PB/PC = índice peso bolsa/peso corporal X 1000; TB = Tamanho da bolsa; PB = Peso da bolsa; COCCI = coccidiose presente ou ausente; ESCORE = grau de lesão na bolsa; PESO = peso corporal do frango; SD= desvio padrão; EP = erro padrão; CV = coeficiente de variação.

^{*} ausência de coccidiose para efeito de cálculos foi representada pelo dígito 1 e presença pelo dígito 2

Na análise de Regressão para peso, com cada uma das variáveis individualmente, só foram obtidos resultados significativos (p<0,05) para PB, TB, PB/TB, ELISA e COCCI. Na análise para PESO contra ESCORE não foi obtida significância, o que quer dizer que ESCORE não é um bom fator preditivo de peso quando analisado isoladamente.

Todos os possíveis modelos de Regressão para peso, combinando as diferentes variáveis foram analisados (regressão "stepwise"), na busca do melhor coeficiente de determinação (R²), o que foi obtido com a seguinte fórmula:

PESO =1669,9 - PBPC(
$$X_1$$
)+TB(X_2)+PB(X_3)- COCCI(X_4)+ ELISA(X_5) - ESCORE(X_6)

onde o peso das aves foi significativamente dependente (p<0,05) do índice PB/PC, PB, TB, COCCI, ELISA e ESCORE que explicaram 82,14% (R²= 0,8214) do peso corporal. Esses resultados predizem que quanto menor o valor do índice PB/PC, menor o escore de lesões e ausência de coccidiose, maior será o peso da ave. Quanto maior o tamanho da bolsa e maior o coeficiente S/P de absorbância no ELISA, maior será o peso da ave (TABELA 2).

TABELA 2: VALORES DE REGRESSÃO PARA PESO COMO VARIÁVEL DEPENDENTE FRENTE A SEIS FATORES INDEPENDENTES

FATORES PREDITIVOS	COEFICIENTE	ERRO PADRÃO
CONSTANTE	1669,9	150,73
PB/PC	-2585,9	131,37
ТВ	129,35	32,935
РВ	1157,1	70,892
COCCI*	-3,2187	37,513
ELISA (S/P)	53,727	46,507
ESCORE	-14,039	23,517

 Número de casos 30
 ANOVA

 Graus de liberdade
 123

 Fator preditivo
 94,31
 p<0,05</td>

 R²
 0,8214

 Resíduo
 0,0003758

^{*} ausência de coccidiose para efeito de cálculos foi representada pelo dígito 1 e presença, pelo dígito 2

Em outra análise de Regressão, PB foi explicado por TB (**Figura 8**) em 62% (R²) de forma significativa (p<0,05), gerando a seguinte fórmula:

$$PB = -1,6326+0,71776(TB)$$

Na última etapa de Regressão, na análise da relação ESCORE e índices PB/PC e PB/TB, a seguinte equação foi obtida:

ESCORE =
$$2,3770 - (PB/PC)(X_1) + (PB/TB)(X_2)$$
,

onde ESCORE foi explicado por PB/PC e TB/PB em 7,7% (R²) de forma significativa (p< 0,05). Estes resultados predizem que quanto menor o índice PB/PC, mais graves podem ser as lesões encontradas na bolsa (ESCORE ↑) e quanto menor o índice PB/TB, lesões menos graves (ESCORE ↓) serão encontradas (**TABELA 3**).

TABELA 3: ÍNDICES PB/PC E PB/TB COMO FATORES PREDITIVOS NO ESCORE DE LESÕES MICROSCÓPICAS NA BOLSA DE FABRÍCIO DE FRANGOS DE CORTE AO ABATE

FATORES				
PREDITIVOS		OEFICIENTE	Erro Padrão	
CONSTANTE		2,3768	0,1789	
PB/PC		- 0,9056	0,33762	
PB/TB		1,4526	1,0597	
Número de casos Graus de Liberdade	130 127	ANO	/A	
Fator preditivo R ² Resíduo	5,277 0,0767 0,5315	p< 0,0	05	

A proporção do aparecimento de enfermidades à necrópsia em relação ao ESCORE foi analisada e a diferença entre as variáveis foi significativa (p< 0,05) entre elas e dentro delas. Isto significa que o número de casos de cada enfermidade observada à necrópsia foi diferente estatisticamente entre elas, e diferente para a mesma enfermidade, de acordo com a gravidade das lesões encontradas na bolsa de Fabrício (TABELA 4).

TABELA 4: PROPORÇÃO DE ENFERMIDADES DETECTADAS À NECRÓPSIA EM FRANGOS DE CORTE AO ABATE COM LESÕES MICROSCÓPICAS NA BOLSA FABRÍCIO

TOTAL	Esco	RE DE LESÕES MI DE FAB		TOTAL DE AVES	
Aves/Escore	0	1	2	3	n (%)
ÈNFERMIDADES À NECRÓPSIA	0	24 (18,46)	48 (36,92)	58 (44,62)	130 (100,00)
Coccidiose	0	14 (10,77)	29 (22,31)	31 (23,85)	74 (56,92)
Aerossaculite	0	13 (10,00)	18 (13,85)	27 (20,77)	58 (44,62)
Pericardite	0	5 (3,85)	10 (7,69)	23 (17,69)	38 (29,23)
Lesão na cabeça do fêmur	0	5 (3,85)	11 (8,46)	15 (11,54)	31 (23,85)
Verminose	0	2 (1,54)	6 (4,62)	8 (6,15)	16 (12,31)
Hemorragia na ponta da asa	0	1 (0,77)	6 (4,62)	4 (3,08)	11 (8,46)
Lesão no coxim plantar	0	1 (0,77)	2 (1,54)	5 (3,85)	8 (6,15)

Qui-quadrado Kruskal-Wallis, p<0,05

A proporção do aparecimento de enfermidades em relação às faixas de peso estudadas após a análise também mostrou diferenças significativas estatisticamente (p<0,05) entre a aparecimento das diversas enfermidades entre si e entre o aparecimento de enfermidades nas diferentes faixas de peso (TABELA 5).

^{*} Escore 0, sem lesões; escore 1, discretas lesões, leve hiperplasia, discreta rarefação linfóide folicular; escore 2, sinais de inflamação, atrofia de folículos, rarefação linfóide, degeneração e necrose folicular; escore 3, atrofia severa, cistos foliculares e epiteliais, fibrose

TABELA 5: PROPORÇÃO DE ENFERMIDADES ENCONTRADAS À NECRÓPSIA EM RELAÇÃO A FAIXA DE PESO CORPORAL DE FRANGOS DE CORTE AO ABATE

	FAIXA			
TOTAL	_	N (%)		TOTAL DE AVES
	1000 a 1500g	1750 a 2250g	2500 a 3000g	N(%)
ENFERMIDADES À NECRÓPSIA	21 (16,15)	80 (61,54)	29(22,31)	130(100,00)
Coccidiose	18 (13,85)	44 (33,85)	12(9,23)	74 (56,92)
Aerossaculite	13 (10,00)	30 (23,08)	15(11,54)	58 (44,62)
Pericardite	6 (4,62)	24 (18,46)	8(6,15)	38 (29,23)
Lesão na cabeça do fêmur	5 (3,85)	17 (13,08)	9(6,92)	31 (23,85)
Verminose	2 (1,54)	10 (7,69)	5(3,85)	17(13,08)
Hemorragia na ponta da asa	1 (0,77)	3 (2,31)	7(5,38)	11 (8,46)
Lesão no coxim plantar	1 (0,77)	3 (2,31)	4(3,08)	8(6,15)

Qui-quadrado Kruskal-Wallis, p<0,05

Na Análise de Variância (ANOVA) e teste de Tukey-Kramer (MARTIN et al., 1989) relacionando ESCORE versus COCCI, os escores 1 e 3 de lesão na bolsa de Fabrício diferiram entre si quanto à presença ou não de coccidiose (p<0,05), indicando que houve mais coccidiose quanto maior o escore de lesão encontrado na bolsa de Fabrício (**TABELA 6**).

TABELA 6: PRESENÇA E AUSÊNCIA DE COCCIDIOSE EM FRANGOS DE CORTE AO ABATE EM RELAÇÃO AO ESCORE DE LESÕES MICROSCÓPICAS NA BOLSA DE FABRÍCIO

LESÕES MICROSCÓPICAS NA								
BOLSA DE FABRÍCIO	Coco	IDIOSE	FRANGOS DE CORTE (N)					
ESCORE	Positivo	NEGATIVO	TOTAL					
0	0	0	0					
1	14	10	24 ^{a*}					
2	28	20	48 ^{ab}					
3	32	26	58 ^b					
TOTAL	74	56	130					

ANOVA e Tukey-kramer

^{*} faixa central com 250g em torno da média de 2000g do peso total = 1750 a 2250; faixa mais baixa= abaixo de 1750 até o peso mínimo de 1000g; faixa mais alta = acima de 2250 até o peso máximo de 3000g.

^{*} Letras diferentes significam diferença estatística (p<0,05).

5 DISCUSSÃO

A pesquisa da DIB em frangos de corte ao abate é de grande importância por fornecer informações sobre prevalência e fatores relacionados à ocorrência desta doença, como a imunodepressão, que favorece o aparecimento de outras enfermidades. Conseqüentemente o controle da DIB está associado à redução de casos dessas outras patologias que, quando presentes, assumem grande significado econômico e/ou sanitário.

Neste trabalho, com necrópsia dos 130 frangos estudados, foram observadas várias enfermidades relacionadas a causas de condenação no matadouro (BRASIL, 2001). A presença de coccidiose em aproximadamente 56% das aves, aerossaculite em 44% e pericardite em quase 30%, foi um resultado expressivo, principalmente quando relacionado às lesões microscópicas na bolsa de Fabrício. Desta forma ficou demonstrado que a gravidade destas lesões, indicativas de imunodepressão, favoreceram o aparecimento das enfermidades.

A relação destas enfermidades com o peso dos frangos na saída para o abate foi analisada porque, de acordo com Mendes e Patrício (2004), o peso médio dos frangos é um dos índices diretos que têm maior influência no custo de produção de frangos. O peso é responsável pelo faturamento e, conseqüentemente, pela diluição dos custos fixos que chegam a 40% do custo total. Dos 21 frangos na faixa de peso mais baixa (1000 a 1500g), 18 apresentaram coccidiose, 13 aerossaculite e seis (6) pericardite, ou seja, mais da metade das aves nesta faixa de peso estavam doentes, talvez devido a presença das lesões da DIB que tornaram as aves suscetíveis. Esses resultados concordam com os de outros autores que estudaram os efeitos imunodepressivos da DIB em relação a outras enfermidades (ROSENBERGER et al, 1975; WYETH, 1975; ANDERSON et al., 1977).

O acompanhamento das bolsas de Fabrício pelo tamanho foi realizado de acordo com Bernardino (2004) e os resultados obtidos comparados com os padrões para frangos de corte com 35 a 40 dias de idade, indicados por este autor, que classificou bolsas de tamanho 3 ou menores como de aves que sofreram infecção pelo VDIB; tamanhos 4 e 5 como de aves somente vacinadas com cepas intermediárias ou intermediárias plus contra a DIB; e tamanhos 6 e 7 de aves não infectadas. No presente estudo foram encontradas 44 bolsas de Fabrício com tamanho 3, portanto, segundo o referido autor, fora dos padrões para aves vacinadas com vacinas intermediárias. A maioria das bolsas encontradas obteve tamanhos 4 e 5, o que pode significar a ação da vacina intermediária que as aves receberam no 6º e no 17º dia de vida; e oito (8) aves com bolsas 6 e 7, seriam consideradas normais, sem ação de VDIB.

Na observação dos pesos das bolsas em relação ao diâmetro, foi notado que a maioria das bolsas mais leves foram também as menores e que à medida que o tamanho foi maior, o peso também aumentou. Esses resultados estão de acordo com o obtido por Huepe (1999) em que as variações de peso na bolsa de Fabrício se viram refletidas em seu diâmetro.

A atrofia da bolsa foi indicada pelas medidas de peso e tamanho deste órgão, tornando o índice PB/TB um bom indicador da presença de lesões na bolsa. Esses resultados foram corroborados por Rosales et al. (1989), Tsukamoto et al. (1995), Jackwood et al.(1999) e Bolis et al (2003) que utilizaram esse índice para analisar a ação do VDIB em aves.

Tsukamoto et al. (1995) e Bolis et al. (2003) em seus experimentos com vacinas e desafio, observaram que o índice PB/PC caiu muito após o desafio das aves, em função da atrofia na bolsa. Esse índice foi um indicador de infecção, quando foi muito baixo, ou ainda da eficiência de proteção das vacinas, quando assumiu valores maiores. Essas conclusões estão de acordo com os resultados do presente trabalho onde o índice PB/PC também foi um bom fator preditivo de escore de lesões na bolsa.

No presente estudo, das 130 aves investigadas, todas apresentaram lesões na bolsa de Fabrício, em maior ou menor grau. Cinqüenta e oito (58) aves apresentaram lesões severas (escore 3), na saída do lote. Se for considerado que as

aves foram vacinadas no 6° e 17° dia de idade com cepa vacinal intermediária e que as lesões encontradas, nas aves mencionadas, foram muito graves (escore 3), para terem sido provocadas por esta cepa, pode ser sugerido que as aves não estavam protegidas e que foram infectadas. Resultados semelhantes foram encontrados por Bolis et al. (2003) que investigaram aves, aos 42 dias de idade, vacinadas (cepa intermediária plus) aos 14 dias, e desafiadas (cepa virulenta de campo) no 28° dia, e observaram lesões histológicas tão graves quanto às provocadas por vírus de campo em aves suscetíveis. Entretanto em outro grupo de aves vacinadas (cepa forte) e desafiadas (cepa de campo), o escore de lesões encontrado na bolsa de Fabrício foi menor. Esses autores interpretaram esses resultados como falha na proteção promovida pela cepa intermediária plus frente ao desafio (cepa de campo). As mesmas observações foram feitas por Tsukamoto et al. (1995) que encontraram escores mais elevados (lesões mais graves) nos lotes desafiados, nos quais as vacinas não conferiram proteção.

Rautenschlein et al. (2003) observaram que aves inoculadas com cepa intermediária no 14º dia de idade apresentaram regeneração folicular no 8º dia pósinoculação, enquanto aves inoculadas com cepas virulentas apresentaram atrofia na bolsa até 29 dias após a inoculação. O resultado do presente trabalho em que as lesões microscópicas em frangos vacinados (cepa intermediária) foram encontradas na idade de abate, pelo menos 25 dias após a vacinação, quando comparados com os de Rautenschlein et al. (2003), foram mais semelhantes aos obtidos com a cepa virulenta. A RT/PCR confirmou a presença do VDIB em 9 dos 13 lotes de que as aves foram originadas. Com padrões compatíveis com cepa de campo em 6 desses lotes, o que comprovou que apesar da vacinação algumas aves foram suscetíveis ao desafio pelo VDIB.

Tsukamoto et al (1995) não encontraram diferença nos títulos de anticorpos entre grupos vacinados e desafiados ou apenas vacinados. Esses resultados sorológicos coincidem com os deste trabalho, onde a maioria dos coeficientes S/P de absorbância ao ELISA, encontrados no momento da saída do lote, foram maiores que 0,2. Entretanto a intensidade refletida por um coeficiente de variação de 40%, foi altíssima. Esses resultados discordam de Bernardino (2004) que afirmou que as vacinas intermediárias não induzem a formação de altos títulos de anticorpos e que

os vírus de campo induzem títulos extremamente altos e assim é possível diferenciar se um lote passou por um desafio de campo ou não.

Os resultados sorológicos encontrados no ELISA, associados a outras variáveis preditivas, explicaram o peso das aves, significando que quanto maior o coeficiente S/P, melhor o peso nas condições deste trabalho. Este fato pode ser interpretado como resultado de presença de anticorpos promovendo a saúde e favorecendo o peso das aves.

A análise do escore de lesão na bolsa em relação ao aparecimento de coccidose foi estudada por ter sido esta a enfermidade que teve a sua etiologia diagnosticada e a mais observada nas necrópsias. A diferença estatística (p< 0,05) entre a presença de coccidose em aves com lesões discretas na bolsa (escore 1) e em aves com severas lesões (escore 3) demonstrou que a gravidade das lesões na bolsa favoreceu o aparecimento da enfermidade, o que é compatível com os resultados obtidos por Anderson et al. (1977) em que a exposição precoce ao VDIB resultou em um aumento da suscetibilidade das aves às infecções por *Eimeria tenella* em seu estudo experimental.

No trabalho de Bolis et al. (2003), o peso das aves não foi afetado pelo desafio do VDIB em nenhum dos grupos trabalhados, nem no grupo somente desafiado quando comparado com o grupo controle. Este fato levou a conclusão que a infecção do VDIB por si só não interfere no peso das aves, e foi creditado à ausência de fatores ambientais e infecciosos já que as aves, no referido trabalho, foram criadas em isoladores. Essas observações vêm de encontro aos resultados do presente estudo, em que o peso dos frangos foi explicado (p<0,05) pelas variáveis PB/PC, TB, PB, ELISA, ESCORE e COCCI, mas analisado contra ESCORE isoladamente não obteve significância estatística. Isto comprovou também um somatório na influência das diversas variáveis estudadas sobre o peso.

6 CONCLUSÃO

O presente trabalho nas condições em que foi realizado permite concluir que:

- 1- A maioria dos frangos de corte em idade de abate, apesar de vacinados, sofreu desafio pelo VDIB, confirmado pelo RT/PCR, sem a manifestação de sinais clínicos, mas com quadro de imunodepressão demonstrado pela presença de alterações (peso e tamanho) na bolsa de Fabrício, severas lesões microscópicas e aparecimento de outras enfermidades;
- 2- A gravidade das lesões na bolsa de Fabrício de frangos de corte favoreceu o aparecimento de enfermidades como coccidiose, aerossaculite, lesão na cabeça do fêmur, pericardite, verminose, e essas enfermidades depreciaram o peso afetando a qualidade destes frangos ao abate;
- 3- PB/PC, TB, PB, ESCORE, ELISA e COCCI foram fatores preditivos do peso de frangos de corte ao abate;
- 4- A coccidiose foi um importante fator de risco no peso de frangos de corte ao abate;
- 5- A severidade das lesões na bolsa de Fabrício pode ser monitorada pelos índices PB/PC e PB/TB:

7 OBRAS CITADAS:

ABEF, Associação Brasileira dos Exportadores de Frango, Consumo Brasileiro de Carne de Frango – Série Histórica (1989-2002). Disponível em: <www.abef.com.br>. Acesso em 29 jan 2004

AHMED, Z.; INAYAT, S.; NAEEM, K.; MALIK, S.A. Comparative Immune Response Pattern of Commercial Infectious Bursal Disease Vaccines Against Field Isolates in Pakistan. International Journal of Poultry Science, n2, v.6, p. 449-453, 2003

ANDERSON, W.I.; REID, W.M.; LUKERT, P.D.; Jr. FLETCHER, O.J. Influence of Infectious Bursal Disease on the Development of Immunity to *Eimeria tenella. Avian Diseases*, v. 21, n.4, p. 637-641, 1977.

ASDRUBALI, G.; MUGHETTI, L.; BARBONI, E. Ulteriori Osservazioni Sul Comportamento Della Borsa Di Fabrizio Nella Malattia Di Gumboro Sperimentale. *Nuova Veterinária*, v.50, 1974, p.117-132.

BANDA, A.; VILLEGAS, P.; EL-ATARRACHE, J. Molecular Characterization of Infectious Bursal Disease Virus from Commercial Poultry in the United States and Latin America. Avian Diseases, n. 47, p. 47-95, 2003

BERNARDINO, A. Considerações Sobre o Problema de Gumboro a Campo. In: Il Congresso de Produção e Consumo de Ovos – APA, 2000, São Paulo, *Anais...*São Paulo: APA, 2000, p.45-58

BERNARDINO, A. Controle da Doença de Gumboro – Proposta Fort Dodge. In: II Simpósio da Doença de Gumboro, Campinas, 2001, *Anais*...Campinas : FACTA, 2001, p.143 - 56

BERNARDINO, A. Programas de Vacinações. In: MENDES, A.; Nääs, I.A; Mendes, A. A. *Produção de Frangos de Corte*, FACTA: Campinas, 2004, 356p., Cap12, p.179-203

BINNINGTON, B.; MARTIN, E.; McEWEN, B.; SHAPIRO, J. Highlights of AHL Ontário Poultry Pathology Diagnoses, 2001-2002. *AHL Newsletter*, V.7, N 1, março, 2003. Disponível em: <www.uoguelph.ca/ahl/news-7-1/ANwsl7-1.pd>. Acesso em 15 jan 2004

- BORDIN, E.L. Algumas Considerações Sobre Alterações Anatomopatológicas e Diagnóstico. In: II SIMPÓSIO DA DOENÇA DE GUMBORO, 2001, Campinas, *Anais...*Campinas: FACTA, 2001, p. 75-77.
- BOLIS, D.A. Controle da Doença de Gumboro Proposta Coopers. In: Il Simpósio da Doença de Gumboro, Campinas, 2001, *Anais...*Campinas : FACTA, 2001, p.173 186
- 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 very virulent virus strain In: *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, Campinas, n. 2, v.5, maio/agosto, 2003, p. 137-146
- BRASIL. Decreto 30691 de 29 de março de 1952. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. RIISPOA -Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal DIPOA. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/das/dipoa/RIISPOA.html>. Acesso em: 16 abr 2001
- BRASIL. Portaria no 46 de 10 de fevereiro de 1998. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Manual Genérico de Procedimentos para APPCC em Indústrias de Produtos de Origem Animal. Disponível em: <www.agricultura.br/agrolegis.http>. Acesso em: 22 dez 2002
- BRASIL. Portaria no 210 de 10 de 1998. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento Técnico da Inspeção Tecnológica e Higiênico-Sanitária de Carne de Aves. Disponível em: <www.agricultura.br/agrolegis.http>. Acesso em: 22 out 2003
- BUTCHER, G.D.; MILES, R.D. Infectious Bursal Disease (Gumboro) in Commercial Broilers. *VM-84 College of Veterinary Medicine*, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Science, University of Florida. Disponível em: <www.edis.ias.ufl.edu/pdffiles/VMO2400.pdf>. Acesso em 20 jun 2003
- CARDOSO, B E PEREIRA, V.L.A. Controle da Doença de Gumboro Proposta Lohmann. In: II Simpósio da Doença de Gumboro, Campinas, 2001, *Anais*...Campinas: FACTA, 2001, p.141-42
- CASTILLO, C.J.C.; CUSTÓDIO, C.V. Atributos da Qualidade em Carcaças de Frangos: Vale a pena Avaliar em Nível de Produção Industrial? In: Conferência APINCO 2002 de Ciência e tecnologia Avícolas, 2002, Campinas, *Anais...*Campinas: FACTA, 2002, p.31-46
- CHEN, H.Y.; ZHOU, Q; ZHANG, M.F.; GIAMBRONE, J.J. Sequence Analysis of the Hypervariable Region of Nine Infectious Bursal Disease Virus Isolates from Mainland China. *Avian Diseases*, n.42, p.762-769, 1998
- CHO, B.R. Experimental Dual Infections of Chickens with Infectious Bursal and Marek's Disease Agents. I. Preliminary Observations on the Effect of Infectious Bursal Agent on Marek's Disease. *Avian Diseases*, v.14, p. 665-675, 1970.

- DE HERDT, P.; DUCATELLE, R.; UYTTEBROEK, E.; SNEEP, A.; TORBEYNS, R. Significance of Infectious Bursal Disease Serology in an Integrated Quality Control Program Under European Epidemiologic Conditions, *Avian Diseases*, n.44, p.611-17, 2000
- DI FÁBIO, J. A Doença de Gumboro, Formas de Controle e Como Avaliar a proteção. In: III Simpósio de Sanidade Avícola da UFSM, 2002, Santa Maria, *Anais...* Concórdia : EMBRAPA SUÍNOS E AVES, 2002, p.16-19
- DELAZARI, I. Programas de Segurança de Alimentos na Indústria de Produtos Avícolas. In: Conferência 2003 de Ciência e Tecnologia Avícolas, 2003, Campinas, *Anais*...Campinas: FACTA, 2003, p. 123-126.
- DICKEL, E.L. Barreiras Sanitárias no Comércio Internacional de Carnes de Aves. In: III Simpósio Brasil Sul de Avicultura. Disponível em: <www.cnpsa.embrapa.br/publicações/anais/anais0204-bsa-dickel.pdf> Acesso em: 26 jan 2004
- DORMITORIO, T.V.; GIAMBRONE, J.J.; DUCK, L.W. Sequence Comparisons of the Variable VP2 Region of Eight Infectious Bursal Disease Virus Isolates. *Avian Diseases*, n.41, p.36-44, 1997
- ELFADIL, A. A.; VAILLANCOURT, J. P.; MEEK, A. H.; GYLES, C.L. A Prospective Study of Cellulitis in Broiler Chickens in Southern Ontario. *Avian Diseases*, n. 40, p. 677-689, 1996a
- ELFADIL, A. A.; VAILLANCOURT, J. P.; MEEK, A. H.; JULIAN, R.J.; GYLES, C.L. Description of Cellulitis Lesions and Associations Between Cellulitis and Other Categories of Condemnation. *Avian Diseases*, n. 40, p. 690-698, 1996b
- FALLAVENA, L.C.B. Lesões Cutâneas em Frangos de Corte: Causas, Diagnóstico e Controle. In: Conferência APINCO 2001 de Ciência e Tecnologia Avícolas, 2001, Campinas, *Anais*...Campinas : FACTA, 2001, p.205-216.
- FARAGHER, J.T.; ALLAN, W.H.; WYWETH, C.J. Immunosupressive effect of infectious bursal agent on vaccination against Newcastle disease. *Veterinary Record*, n.95, p.385-388, 1974
- FAROOQ, M.; DURRANI, F.R.; IMRAN, N.; DURRANI, Z.; CHAN, N. Prevalence and Economic Losses Due to Infectious Bursal Disease in Broilers in Mirpur and Kotli Districts of Kashmir. *International Journal of Poultry Science*, n.2, v. 4, p. 267-270, 2003
- GARDIN, Y.; CAMILO, V. Controle da Doença de Gumboro- Proposta Ceva. In: Il Simpósio da Doença de Gumboro, Campinas, 2001, *Anais*...Campinas: FACTA, 2001, p.157-164-42

- HIRAI, , K.; SHIMAKURA, S.; KAWAMOTO, E.; TAGUCHI, F.; KIM, S>T.; CHANG, C.N. The Immunosupressive Effect of Infectious Bursal Disease Virus in Chickens. *Avian Diseases*, v.18, n.1, p. 51-57, 1974.
- HUEPE, J.U. Caracterización Del Desarrollo de la Bolsa de Fabricio, Timo Y Bazo en Pollos Broilers Comerciales. In: XVI Congreso Latinoamericano de Avicultura, Lima, 1999, *Anais...*ALA: Lima, 1999, p. 313-318
- IKUTA, N.; EL-ATRACHE, J.; VILLEGAS, P.; GARCÍA, M.; LUNGE, V.R.; FONSECA, A.S.K.; OLIVEIRA, C.; MARQUES, E.K. Caracterização Molecular de Isolados Brasileiros do Vírus da Doença de Gumboro. Clipping Merial de Avicultura, Ano 2, n.9, set 2002. Disponível em: http://www.avisite.com.br/merial/Clip/rlf/numero9.doc>. Acesso em: 12 mar 2002
- IKUTA, N. Diagnóstico Molecular do Vírus da Doença de Gumboro. In: Il Simpósio a Doença de Gumboro, 2001, Campinas, *Anais*...Campinas : FACTA, 2001, p.94 101
- IPARDES, Instituto Paranaense de Desenvolvimento Econômico e Social. Análise da Competitividade da Cadeia Industrial de Carne de Frango no Estado do Paraná, Instituto Brasileiro da Qualidade e Produtividade e grupo de Estudos e Pesquisas Agroindustriais da UFSCAR, 2002, Curitiba: IPARDES, 2002, 230p.
- JACKWOOD, D.J.; JACKWOOD, R.J. Infectious Bursal Disease Viruses: Molecular Differentiation of Antigenics Subtypes among Serotype 1 Viruses. *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.
- JACKWOOD, D.J.; NIELSEN, C.K. Detection of Bursal Disease Viruses in Commercially Reared Chickens Using the Reverse Transcriptase/Polymerase Chain Reaction Restriction Endonuclease Assay. *Avian Diseases*, n.41, p. 137-143, 1997.
- JACKWOOD, D.J.; SOMMER, S.E. Restriction Fragment Length Polymorphisms in the VP2 Gene of Infectious Bursal Disease Viruses. *Avian Diseases*, n.41, p. 627-637, 1997.
- JACKWOOD, D.J.; SOMMER, S.E. Genetic Heterogeneity in the VP2 Gene of Infectious Bursal Disease Viruses Detected in Commercially Reared Chickens. *Avian Diseases*, n.42, p. 321-339, 1998
- JACKWOOD, D.J.; SOMMER, S.E.; ODOR, E. Correlation of Enzyme-linked Immunosorbent Assay Titers with Protection Against Infectious Bursal Disease Virus. *Avian Diseases*, n.43, p. 189-197, 1999
- KIBENGE, F.S.B; JACKWOOD, D.J.; MERCADO, C.C. Nucleotide sequence analysis of genome segment A of infectious bursal disease virus. *Journal of General Virology*, n.71, p. 569-577, 1990

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, B. A doença de Gumboro na Europa. In: SIMPÓSIO DA DOENÇA DE GUMBORO, 1993, Santos, *Anais*...Campinas : FACTA, 1993, p. 29-35.

KOUWENHOVEN, B. Control of very virulent Gumboro Disease in the Netherlands. *World Poultry Special – Gumboro*, p. 15-16, December 1994.

KREAGER, K. IBD in Egg-type Pullets. *World Poultry Special – Gumboro*, p. 19-20, December 1994.

LOJKIC', I; BIDIN, Z; POKRIC, B. Differentiation of Infectious Bursal Disease Virus Isolated in Croatia. *Avian Diseases*, n. 47, p. 59-65, 2003

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

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

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

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

LUNA, L.G. Manual of histhologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology. 13ed. New York: McGraw-Hill, 1968, 258p.

MAJÓ, N. EL-ATARRACHE; 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

MARTIN, S.W.; MEEK, AH; WILLEBERG, P. *Veterinary Epidemiology*, Iowa State University Press, 1989, 343 p

MARTINS, C.; SOBREIRA, A; LEÃO, J.A. *Técnicas Gerais de Laboratório*. São Paulo : EDART, 1982, 186 p.

MDIC, Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. Barreiras Externas às Exportações Brasileiras para Estados Unidos, Japão e União Européia 2001, Disponível em : <www.desenvolvimento.gov.br/doc/secex/deint/Codir/BarreirasLegislação.PDF>. Acesso em 26 jan 2004

MENDES, A.A. Rendimento e Qualidade da Carcaça de Frangos de Corte. In: Conferência APINCO 2001 de Ciência e Tecnologia Avícolas, Campinas, *Anais*...Campinas : FACTA, 2001, p.79-99

MENDES, A.A.; SALDANHA, E.S.P.B. A cadeia produtiva da carne de aves no Brasil. In: MENDES, A.; Nääs, I.A; Mendes, A. A. *Produção de Frangos de Corte*, FACTA: Campinas, 2004, 356p., Cap1, p.1-35, 2004

MENDES, A.A.; PATRÍCIO, I.S. Controle, registros e avaliação do desempenho de frangos de corte. In: MENDES, A.; Nääs, I.A; Mendes, A. A. *Produção de Frangos de Corte*, FACTA: Campinas, 2004, 356p., Cap 20, p.323-335, 2004

MONTASSIER, H.J. Doença de Gumboro: Imunologia. In: Il Simpósio da Doença de Gumboro, Campinas, 2001, Anais...Campinas : FACTA, 2001, p.37-51

NOVA ZELÂNDIA, BIOSECURITY AUTORITY MINISTRY OF AGRICULTURE FORESTRY. Import risk analysis: Chicken meat and chicken meat products; Bernard Matteus Foods Ltd. Turkey meat preparations form the United Kingdom. Disponível em: <www.maf.govt.nz/biosecurity/pests-diseases/animals/risk/chiken-meat-revised-subs.pdf>. Acesso em 23 fev 2001

OIE, Clasificación OIE de las enfermedades, 2000. Office International des Epizooties. Disponível em: http://www.oie.int/esp/maladies/es_classification.htm. Acesso em: 13 mar 2002

OLIVEIRA, L.C. Novos Critérios na Inspeção industrial e sanitária de aves.In: Conferência Apinco 1995 de Ciência e Tecnologia Avícolas, 1995, Curitiba, *Anais...*Campinas: FACTA, 1995, p.119-134.

PEJKOVSKI, C.; DAVELAAR, F.G.; KOUWENHOVEN, B. Immunosupressive Effect of Infectious Bursal Disease Virus on Vaccination Against Infectious Bronchitis. *Avian Pathology*, n.8, 95-106, 1979

PHOHG, S.F.; HAIR-BEJO, M. OMAR, A.R.; AINI, I. Sequence Analysis of Malaysian Infectious Bursal Disease Virus Isolate and the Use of Reverse Transcriptase Nested Polymerase Chain Reaction Enzime- Linked Immunosorbent Assay for the Detection of VP2 Hypervariable Region. *Avian Diseases*, n. 47, p. 154-162, 2003

RAUTENSCHLEIN, S; Yeh, H.-Y.; SHARMA, J.M. Comparative Immunopathogenesis of Mild, Intermediate and Virulent Strains of Classic Infectious Bursal Disease Virus. *Avian Diseases*, n.47, p. 66-78, 2003

RODRIGUES, O. Paradoxos da Doença Infecciosa da Bursa (DIB). Sanidade Avícola, Ano III, n.8, p.4-5, 2002

ROSALES, A.G.; VILLEGAS, P.; LUKERT, P.D.; FLETCHER, O. J.; MOHAMED, M.A.; BROWN, J. Isolation, Identification, and Pathogenicity of Two Field Strains of Infectious Bursal Disease, *Avian Diseases*, n.33, p. 35-41, 1989

- ROSALES, G. Diagnóstico e sorologia na doença de Gumboro. In: SIMPÓSIO DA DOENÇA DE GUMBORO, 1993, Santos, *Anais*...Campinas : FACTA, 1993, p. 46-48.
- ROSALES, G. Control programs and assessment of immunity in broilers and broilers breeders. *World Poultry Special Gumboro*, p. 21-23, December, 1994.
- ROSALES, A.G. Novas Perspectivas no controle de Doenças Virais: Enfermidade de Gumboro. In: Conferência APINCO 1999 de Ciência e Tecnologia Avícolas, 1999, Campinas, *Anais...* Campinas: FACTA, 1999, p. 67-72.
- ROSENBERGER, J.K.; KLOPP, S.; ECKROADE, R.J.; KRAUSS, W.C. The Role of the Infectious Bursal Agent and Several Avian Adenoviruses in the Hemorragic Aplastic- Anemia Syndrome and Gangrenous Dermatitis. *Avian Diseases*, n.4, v.19, p.717-729
- ROSENBERGER, J.K. and Jr. GELB, J. Response to Several Avian Respiratory Viruses as Affected by Infectious Bursal Disease Virus. *Avian Diseases*, v.22, p. 95-105, 1978
- ROSENBERGER, J.K.; KLOPP, S.; ECKROADE, R.J.; KRAUSS, W.C. The Role of the Infectious Bursal Agent and Several Avian Adenoviruses in the Hemorragic-Aplastic-Anemia Syndrome and Gangrenous Dermatitis. *Avian Diseases*, v.19, n.4, p. 717-729, 1979.
- SALAS, M.M.; ICOCHEA, E.D.A.; GAVIDIA, C.C.; Comparación de Una Prueba de ELISA Estándar y ELISA de Rango Extendido para la Enfermidad Infecciosa de La Bursa en Aves. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, n. 13, V. 1, p. 67-71, 2002
- SAMBROOK, J. FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. *Molecular Cloning: Laboratory Manual*. New York/USA: Cold Spring Harbor Press, 1989, 859,p.
- SAYD, S. Comparación entre la prueba ELISA estandar y de rango extendido para vírus de la enfermidad infecciosa de la bursa utilizando diferentes vacunas. In: XVI Congreso Latinoamericano de Avicultura, Lima 1999, *Anais...*ALA: Lima, 1999, p.304-305
- SCUDELLER, A.C. Levantamento de Condenações de Carcaças de Aves em Linha de Abate, *Monografia*, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, 1997.
- SHARMA, J.M. Effect of Infectious Bursal Disease Virus on Protection Against Marek's Disease by Turkey Herpesvirus Vaccine. *Avian Diseases*, n. 3, v28, 1984
- SIMON, V.; ICHIZUKA, 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
- SOLIS, J. Doença de Gumboro: Perspectivas e Controle. In: V Simpósio ACETAV de Atualidades Avícolas, 2000, Fortaleza, *Anais...*Fortaleza: ACETAV, 2000, p. 35-40.

SPRINGER, W.T.; OLSON, N.O.; KERR, K.M.; FABACHER, C.J. Responses of Specific- Pathogen-Free Chicks to Concomitant Infectious of Reovirus (WVU-2937) and Infectious Bursal Disease Virus. *Avian Diseases*, v.27, n. 4, p. 911-917, 1982.

TESSARI, E.N.C.; CARDOSO, A.L.S.P.; CASTRO, A.G.M. Avaliação de "Kits" Comerciais de Teste de ELISA para a Detecção de Anticorpos contra o Vírus da Doença de Gumboro em Plantéis Avícolas Vacinados. Arquivo do Instituto Biológico de São Paulo,, n. 1 v.70, p. 55-59, jan-mar, 2003

TSUKAMOTO, K. et al. Efficacy of Three Live Vaccines Against Highly Virulent Infectious Bursal Disease Virus in Chickens With or Without Maternal Antibodies. *Avian Diseases*, n.39, p. 218-229, 1995

UBA, União Brasileira dos Avicultores. Carne de Frango - Janeiro a Dezembro de 2003. Disponível em: kww.uba.org.br. Acesso em: 26 jan 2003

UE/BÉLGICA. União Européia. Memorandum of Understanding for the implementation of European Concerted Research Action designated as COST Action 839. Immunosupressive Viral Diseases in Poultry. In: II International Symposium of Infectious Bursal Disease and Chicken Infectious Anemia COST Meeting, Germany, jun 2001. Disponível em:http://www.home.pages.at/cost 839/mou.htm. Acesso em: 13 março 2002.

VAN DEN BERG, T.P. Acute Infectious Bursal Disease in Poultry: a Review. *Avian Pathology*, n. 29, p.175-194, 2000

WYETH, P.J. Effect of infectious bursal disease on the response of chickens to S typhimurium and E coli infections. *Veterinary Record*, v.96, p. 238-243, 1975.

YUASA, N.; TANIGUCHI, T.; YOSHIDA, I. Effect of Infectious Bursal Disease Virus Infection on Incidence of Anemia by Chicken Anemia Agent. *Avian Diseases*, v.24, n. 1, p. 202- 240, 1980.

ZAYAS, M.P.; RODRIGUEZ, Y.G.; MESA, J.L.M.; CURBELO, C.A.S.; GONZÁLEZ, D.C.; PRIETO, I.S. Caracterizacion Molecular de Aislamentos Cubanos del Virus de La Enfermidad de Gumboro. In: XVI Congreso Latinoamericano de Avicultura, Lima, 1999. *Anais.*..ALA: Lima, 1999, p. 283-285

8 OBRAS CONSULTADAS

ABREU, E.S.; TEIXEIRA, J.C.A. *Apresentação de trabalhos monográficos de conclusão de curso*. Niterói : Editora da Universidade Federal Fluminense – EDUFF, 6 ed, 2003, 86p.

PEREIRA, M.G. *Epidemiologia Teoria e Prática*, Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 1995, 596p.

RIDDELL, C. *Avian Histopathology*, Pennsylvania : American Association of Avian Pathologists, 2 ed., 1996, 234p.

RODRIGUEZ-CHAVES, I.R.; ROSENBERGER, J.K.; CLOUD, S.S. Characterization of the Antigenic, immunogenic, and pathogenic variation of infectious bursal disease virus due to propagation in different host systems (bursa, embryo, and cell culture).I. Antigenicity and immunogenicity. *Avian Pathology*, n.31, p.463-471, 2002

RODRIGUEZ-CHAVES, I.R.; ROSENBERGER, J.K.; CLOUD, S.S. Characterization of the Antigenic, immunogenic, and pathogenic variation of infectious bursal disease virus due to propagation in different host systems (bursa, embryo, and cell culture).II. Antigenicity at the epitope level. *Avian Pathology*, n.31, p.473-483, 2002

ROSENBERGER, J.K. Immunosupressive Conditions in Chickens. *Poultry Digest Online*, V3, N 12. Disponível em: http://www.wattnet.com. Acesso em: 02 janeiro 2004

WIT,J.J.; DREN, C.N. Report of the 2002 Meeting of Cost 839 Working Group 2: Diagnosis and Economic Impact. Disponível em: http://cost839.var.fgov.be/ ReportWG2-2002.htm>. Acesso em: 02 janeiro 2004

9 APÊNDICE

9.1 MODELO DE FICHA DE COLETA:

FICHA DE COLETA			D.	ATA:_		/	/			
Nº da Empresa:			Re	Região: NE \square SE \square S \square CO \square						
Identificação do Lote:					Nº de aves no lote:					
Idade do Lote ao Abate:					so Médio	·				
CA					abilidade					
FEP:				De	nsidade:					
À NECRÓPSI	A:									
1- Problemas	de pel	e:								
			$\operatorname{Sim}\square$				Não□			
Descrição:										
2- Problemas	respir	atórios:								
Dogariaão:			$Sim\ \Box$				Não □			
Descrição:										
3- Outros acha	ados.									
	iuos.									
							:_			
_4- Bolsa de I			2				I 7	0	0	110
Ave Peso	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Ave										
Tamanho da bolsa										
Peso bolsa										

9.2. BOLSA DE FABRÍCIO NORMAL DE FRANGO DE CORTE

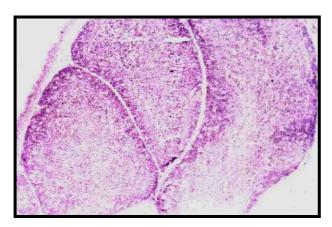
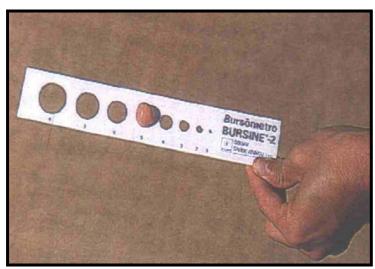


FIGURA 15: Frango de corte. Bolsa de Fabrício. Ausência de lesões, folículos íntegros com população linfóide normal e epitélio preservado, **escore 0**. HE.100X.

10 ANEXOS

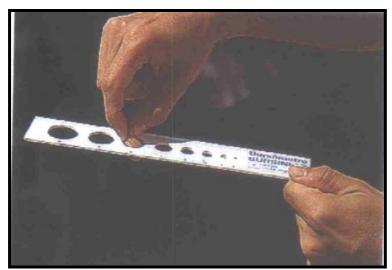
10.1 Uso do Bursômetro (BERNARDINO, 2004)

Na avaliação com o uso do bursômetro, as bolsas de Fabrício são medidas e os resultados registrados para criação de um banco de dados. A avaliação deve ser criteriosa e a bolsa não deve ser forçada a passar por um orifício, ou seja se a bolsa não passar por si só pelo orifício, deve-se considerar como tamanho o próximo orifício, mesmo que o órgão passe com muita sobra (Figuras 16 e 17).



Fonte: Bernardino, 2004

FIGURA 16: Bolsa de Fabrício medida no bursômetro – medida errada



Fonte: Bernardino, 2004

FIGURA 17: Bolsa de Fabrício medida no bursômetro – medida correta

10.2 CLASSIFICAÇÃO DO TAMANHO DE BOLSAS DE FABRÍCIO NO BURSÔMETRO

QUADRO 4: CLASSIFICAÇÃO DA BOLSA DE FABRÍCIO NO BURSÔMETRO

	ESCORE NO BURSÔMETRO								
IDADE	E	BEM VACINADAS		Não V	/ACINADAS				
	Intermediária	INTERMEDIÁRIA-	FORTE	S/ DESAFIO	C/ DESAFIO***				
		PLUS							
21- 25 dias	4-5	4-5	3-4*	4-5	<=3				
35- 40 dias	4-5	3-4-5**	3-4	5-6-7	<=3				

^{*} Se a vacina forte usada somente a partir de 21 dias, o tamanho das bolsas será 4 e 5. ** Nessa idade, a maioria das bolsas estará no padrão 4, porém pode existir uma variação de 10% a 20% com bolsas no tamanho 3 e/ou 5.*** No caso de VDIB muito patogênico as bolsas podem alcançar os tamanhos 7-8, três dias após a infecção, devido ao processo inflamatório e acúmulo de material gelatinoso; em seguida o processo de atrofia tem início, com algumas bolsas totalmente hemorrágicas e depois totalmente atrofiadas, chegando aos tamanhos 2-3.

Fonte: BERNARDINO, 2004

10.3 CÁLCULOS PARA O ELISA

10.3.1 Média do Controle Negativo (NCx)

10.3.2 Média do Controle Positivo (PCx)

10.3.4 Cálculo do Coeficiente S/P

$$\frac{\text{M\'edia da Amostra} - \text{NCx}}{\text{PCx} - \text{NCx}} = \text{S/P}$$

10.4 REAGENTES PARA A RT/PCR

10.4.1 Tampão TRIS-EDTA (TNE) pH 8,3

A. Material:

- a. Proveta graduada 500 mL
- b. 2 Beckers de vidro estéril
- c. Balança analítica
- d. pHâmetro
- e. Tris
- f. EDTA
- g. Água destilada

B. Procedimento:

Solução 1: Tris 10mM pH 8,0

Água destilada 300mL

Tris 1,211g

Solução 2: EDTA 1mM pH 8,0

Água destilada 300mL

EDTA 0,3722g

Solução 3: Na Cl (100mM) 5,844g

Água destilada 300mL

Unir as três soluções e completar o volume para 1000mL com água

destilada

Checar o pH da solução final

Autoclavar por 15 minutos

10.4.2 Tampão Te Dextrose

A. Material:

- a. Pipeta de 20 mL
- b. Balança analítica
- c. Frasco de vidro estéril
- d. Tampão TE pH 8,3
- e. Dextrose

B. Procedimento:

Pesar 2g de dextrose

Acrescentar a 20 mL de Tampão TE pH 8,3 em frasco de vidro estéril.

10.4.3 Tampão Tris- Borato-EDTA (TBE) 5x

A. Material:

- a. Balança analítica
- b. Pipeta de 20 mL
- c. Proveta de 1000 mL

- d. Vidro âmbar volume 1000 mL
- e. Tris base
- f. Ácido bórico
- g. EDTA 0,5 M pH 8,0
- h. Água destilada

B. Procedimento:

Pesar: Tris base 54,0 g Ácido bórico 27,5 g

Colocar no vidro e acrescentar 20 mL de EDTA Completar o volume de 1000 mL com água destilada.

10.4.4 Solução de Sódio Dodecil Sulfato (SDS) A 10% pH 7,2

A. Material:

- a. Proveta de 250 mL
- b. Balança analítica
- c. SDS
- d. Água destilada
- e. Frasco de vidro estéril para volume de 200mL

B. Procedimento:

Colocar 150 mL de água destilada na proveta

Pesar 20g de SDS e colocar no frasco de vidro estéril

Acrescentar a água destilada e completar o volume para 200 mL.

10.4.5 Gel de Agarose a 2%

A. Material:

- a. Balança analítica
- b. Forno de microondas

- c. Proveta de 250 mL
- d. Pipeta de 20 mL
- e. Frasco de vidro estéril de 500 mL
- f. Agarose ultrapura para Biologia Molecular
- g. Tampão TBE 5X
- h. Água destilada

B. Procedimento:

Pesar 5,0 g de agarose e colocar no vidro estéril;

Dissolver em 225 mL de água destilada;

Levar a solução ao forno de microondas até a completa dissolução da agarose, sem deixar ferver.

Adicionar 25 mL de tampão TBE 5X.

10.4.6 Tampão de Arrasto

A. Material:

- a. Proveta de 200 mL
- b. Pipeta de 20 mL
- c. Balança analítica
- d. Frasco de vidro âmbar estéril
- e. Azul de bromofenol
- f. Sucrose
- g. Água destilada

B. Procedimento:

Pesar 40g de sucrose

Colocar 100mL de água destilada no vidro com 0,25 mL de azul de bromofenol, acrescentar a sucrose e armazenar a 4°C

10.4.7 Brometo de Etídio 5µg/ml

A. Material:

- a. Proveta de 250 mL
- b. Micropipeta para 100µL
- c. Frasco estéril
- d. Brometo de etídio 10mg/mL

B. Procedimento:

Adicionar 100 µL de brometo de etídio a 200 mL de água destilada.

10.4.8 PBS pH 7,4

1- Material:

- a. Balança analítica
- b. Proveta de 1000 mL
- c. KH₂PO₄
- d. NaCl
- e. NaOH
- f. Água destilada

2- Procedimento:

KH₂PO₄ 0,68g

NaCl 8,50g

NaOH 0,15g

Água destilada 1000 mL

Colocar em frasco de vidro e autoclavar por 15 minutos