

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JÉSSICA CRISTHINE GALLEGO

**ROTAVÍRUS AVIÁRIO: OCORRÊNCIA, CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL
ELETROFORÉTICO E AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E
MORFOMÉTRICA EM FRANGOS DE CORTE NATURALMENTE
INFECTADOS.**



PALOTINA-PR

2016

JÉSSICA CRISTHINE GALLEGO

ROTAVÍRUS AVIÁRIO: OCORRÊNCIA, CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL
ELETROFORÉTICO E AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E MORFOMÉTRICA
EM FRANGOS DE CORTE NATURALMENTE INFECTADOS.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, área de concentração em Saúde Animal, linha de pesquisa em Microbiologia Aplicada à Produção Animal, Setor Palotina, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Elisabete Takiuchi

PALOTINA-PR

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

G166 Gallego, Jéssica Cristhine
Rotavírus aviário: ocorrência, caracterização do perfil eletroforético e avaliação histopatológica e morfométrica em frangos de corte naturalmente infectados/ Jéssica Cristhine Gallego. – Palotina, 2016.
79f.

Orientador: Elisabete Takiuchi
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal.

1. Avaliação histopatológica. 2. Histomorfometria.
3. Rotavírus aviário. I. Takiuchi, Elisabete. II. Universidade Federal do Paraná.

CDU 636.5



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRO-REITORIA DE PESQUISA E POS-GRADUAÇÃO
Setor PALOTINA
Programa de Pós Graduação em CIÊNCIA ANIMAL
Código CAPES: 40001016077P6

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **JESSICA CRISTHINE GALLEG**O, intitulada: "**ROTAVÍRUS AVIÁRIO: OCORRÊNCIA, CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL ELETROFORÉTICO E AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E MORFOMÉTRICA DE FRANGOS DE CORTE NATURALMENTE INFECTADOS**", após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO.

Palotina, 12 de Agosto de 2016.

Prof ELISABETE TAKIUCHI
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

Prof ALINE DE MARCO VIOTT
Avaliador Interno (UFPR)

Prof ELIS LORENZETTI
Avaliador Externo (UEL)

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Jéssica Cristhine Gallego, filha de Silvio Gallego e Neiva Fátima Cappellesso Gallego, natural de Londrina, 25 de junho de 1991. Médica Veterinária formada pela Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina em 2013. Em 2014 ingressou no mestrado em Ciência Animal da Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina. Atuando principalmente na área de Virologia Animal.

*“Entre o que eu penso, o que quero dizer, o que digo e o que você ouve,
o que você quer ouvir e o que você acha que entendeu, há um abismo.”*

Alejandro Jodorowsky

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior CAPES.

À banca de defesa Doutora Elis Lorenzetti, e professora Doutora Aline de Marco Viott por ter aceito o convite e pela contribuição na melhoria do trabalho.

Às parcerias estabelecidas sem as quais o projeto não seria possível com os médicos veterinários Msc. Ricardo Scherer Simões e Cassiano Pasa junto à colaboração dos produtores em nos receber. Ao Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Paraná sob a supervisão da professora Doutora Aline de Marco Viott e colaboração no processamento e análise histológica da residente Mônica Regina de Matos, e a mestranda Tatiane Caleffo. Ao professor Doutor Sérgio Fernandes na análise estatística. Ao laboratório de Virologia Animal da UEL pelo sequenciamento genômico do rotavírus D. O enriquecimento do trabalho é notável a partir dessas colaborações.

Agradeço ainda, ao pessoal do Laboratório de Experimentação Avícola (LEA) da Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina, pela receptividade sempre que eu precisava tirar dúvidas sobre avicultura, manejo, linhagem de frango, enfim todo o universo que circunda a nossa pesquisa.

À minha orientadora, professora Doutora Elisabete Takiuchi, pela confiança no nosso trabalho, por me permitir extrapolar nossas linhas de pesquisa não meramente por publicações, mas pelos questionamentos e possibilidades de sanar dúvidas, e quando não possível acabar com as dúvidas, sempre questionar mais com disposição, iniciativa e principalmente embasamento técnico. Agradeço assim, não só por mais essa meta alcançada com seu apoio, mas toda a trajetória que me trouxe até aqui. Profissionalmente por sua forma crítica e correta de exigir dos seus orientados o que é pesquisa, e pessoalmente por toda admiração que é capaz de nos

mostrar na paixão pela ciência. E consegue isso, mesmo com todas as barreiras que enfrentamos na pesquisa brasileira.

E por essa orientação, pude contar durante o período do mestrado com uma equipe de trabalho dedicada para realização desse grande projeto. E conseqüentemente competentes com o “fim” e preparadas para outros desafios. Principalmente a Daniela Lorencena, iniciação científica ligada ao projeto que desde o início esteve presente de forma ativa, com grande habilidade para a rotina laboratorial e interessada nos “porquês” da pesquisa. Aprendi muito com ela e espero ter passado de forma produtiva o que eu também já havia aprendido. A Carolina Mucellini, Giulia Casagrande e Ruana Renostro por toda ajuda, mesmo nas técnicas inacabáveis em que vocês estavam dispostas a ver um fim. MUITÍSSIMO obrigada! É muito bom ter pessoas aptas a realizar um trabalho e ainda por cima divertidas junto da gente. Às minhas queridas amigas, hoje colegas de mestrado, Andressa Kunz e Janaína Lustosa pelo interesse no meu projeto, e a disposição em me ajudar, espero contribuir na pesquisa de vocês o quanto vocês contribuíram e acreditaram na minha. E de forma geral e felizmente não só profissional, a amizade que se criou e as que se mantêm dentro do nosso laboratório e fora dele.

Devo agradecer a Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina, onde fiz minha graduação em medicina veterinária, continuei meus estudos na Pós-Graduação em Ciência Animal e hoje também é meu local de trabalho junto a outros técnicos administrativos em educação. Me orgulho de pertencer a uma categoria que luta por uma universidade de qualidade com respeito aos seus servidores, a qual em menos de dois anos me senti acolhida e disposta a contribuir para o reconhecimento do nosso trabalho como técnicos na formação de pessoas e na contribuição efetiva da pesquisa e administração da Universidade. Especialmente ao Departamento de Biociências de forma geral pelo apoio aos meus estudos, espero retribuir de forma competente aos anseios e novos desafios na rotina de trabalho. As minhas colegas de convívio diário Cleuza Montanucci, Fernanda Cripa, Mara Zadinello, Zenaide Claus, Eliete e Pâmela pela feliz harmonia em que podemos trabalhar, e por todos os momentos de descontração.

Às minhas amigas de longa data Carlye, Cláudia, Gisele, Juliana, Lilian e Mariana pela compreensão nas minhas ausências. Aos novos amigos que pude conhecer Cristiane e Alexandre vocês são pessoas maravilhosas que eu espero poder ter sempre na vida.

À Izabel Gogone, e toda a onda de otimismo e sorrisos que sua presença inundou na minha vida. Obrigada por acreditar em mim, mesmo quando eu não acredito. Por me ensinar a amar os gatos! Eu nunca havia conhecido uma pessoa de coração tão bom quanto o seu, e espero nunca afastar ele de mim.

À minha pequena família, meus pais Neiva e Silvio e minhas irmãs Nicole e Raissa que me apoiam nas dificuldades, e sempre estarão comigo para comemorar as vitórias. À minha grande família avós, tias, tios e primos, simplesmente por serem família! À Maria Helena Vargas, que em pouquíssimo tempo já virou família.

Aos meus amores animais Dom Corleone, meu parceiro de mestrado e filho felino, e ao pequeno Valentino por ter aparecido de forma tão inesperada e agora já faz parte do núcleo felino da casa. À Dorinha por estar sempre disposta a oferecer amor, e por ficar linda roncando no sofá. À Moa pela sua agitação característica que enche a casa de alegria. Agradeço também aos meus queridos “felinistas” Bob, Yolanda, Lilica, Murce, Pitoco, Feiosa, Marley e Missy por serem sempre tão receptivos e carinhosos.

RESUMO

Na produção avícola as infecções entéricas afetam diretamente o desempenho das aves. A detecção de rotavírus aviário (AvRV) tem sido associada à enterite em frangos de corte e a Síndrome da Má Absorção (SMA). Este estudo teve como objetivos investigar a frequência da ocorrência de AvRV; caracterizar os eletroferogramas de AvRV e avaliar histologicamente o intestino delgado de frangos de corte naturalmente infectados. Foram coletadas amostras individuais de conteúdo entérico e três porções do intestino delgado (P1/P2/P3) de frangos de corte refugo com sinais da SMA (n=256), de frangos de corte clinicamente saudáveis (controle) (n=24), e amostras de cama (n=36) de 12 lotes aviários do município de Palotina com diferentes índices de eficiência produtiva (IEP). Para detecção do AvRV no conteúdo entérico foi utilizada a eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA). As porções do intestino dos frangos positivos na EGPA para AvRV e das frangos controle foram avaliadas histologicamente. AvRV foi detectado em 10/12 (83%) dos lotes avaliados, e em 60/256 (23,44%) das amostras de frangos refugo, tendo sido identificados os perfis eletroforéticos de rotavírus aviário espécie A (AvRV-A), rotavírus aviário espécie D (AvRV-D) e rotavírus aviário espécie F (AvRV-F) em 9 (15%), 18 (30%) e 33 (55%) amostras, respectivamente. Nas amostras de frangos clinicamente saudáveis foi identificado o perfil AvRV-A e AvRV-D em duas amostras distintas. Em 29 (11,3%) das amostras o perfil foi inconclusivo. Nas amostras de cama foi possível detectar AvRV-A e AvRV-F em lotes distintos de IEP ruim, e AvRV-F em um lote de IEP regular. A taxa de detecção de AvRV foi estatisticamente maior em lotes de IEP ruim quando comparado ao IEP bom. As lesões avaliadas foram compatíveis com a SMA, e mais acentuadas nos casos associados à infecção pelo AvRV-A. Na histomorfometria, a redução do comprimento de vilo e relação vilo/cripta nas porções mais craniais do intestino delgado foram estatisticamente significativas dos frangos de corte infectados por AvRV quando comparadas às amostras controle. Este estudo relata a ocorrência das espécies A, D e F em frangos de corte de plantéis comerciais e demonstra indícios da associação do AvRV com a SMA.

Palavras-chave: rotavírus, frango de corte, índice de eficiência produtiva, avaliação histopatológica, histomorfometria, síndrome da má absorção

ABSTRACT

Avian rotavirus: occurrence, electrophoretic profile characterization and histopathological and morphometric evaluation in broilers chickens naturally infected.

Enteric infections in poultry production affects directly the performance of the birds. The detection of avian rotavirus (AvRV) has been associated with enteritis in broiler chickens including Malabsorption Syndrome (MAS). This study aimed to investigate the frequency of occurrence of AvRV; to characterize AvRV electropherogroups and to evaluate histologically the small intestines of naturally infected broiler chickens. A total of 256 individual of intestinal content samples and portions of the small intestine of chick culling with clinic signs of MAS were collected, 24 were of healthy broilers (control), and 36 of broiler litter samples of twelve broiler flocks from Palotina/PR, with different Productive Efficiency Index (PEI). For the detection of AvRV in the intestinal content, the polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) technique was used. The portions of the intestine of positive broilers for AvRV and control broiler were evaluated histologically. AvRV was detected in 10/12 (83%) of the evaluated broiler flocks and in 60/256 (23.44%) samples of chick culling, in which the typical migration profile of AvRV-A, AvRV-D and AvRV-F were been identified, in 9 (15%), 18 (30%), and 33 (55%) samples, respectively. In 29/256 (11.3%) of the samples the profile was inconclusive. The AvRV detection rate was statistically higher in broiler flocks with poor PEI when compared to good PEI. The evaluated lesions were compatible with MAS; with greater severity in cases associated with AvRV-A infection. In histomorphometry, reducing the length of villi and villous/crypt ratio in the most cranial portion of the small intestine were statistically significant in AvRV infected birds when compared to control samples. This study shows the occurrence of species A, D and F in broiler chickens of comercial flocks and shows evidence of association of AvRV with MAS.

Keywords: *rotavirus, broiler chicken, zootechnical performance, histopathological evaluation, histomorphometry, runting stunting syndrome.*

LISTA DE ABREVIATURAS

ABPA	- Associação Brasileira de Proteína Animal
AvRV	- <i>Avian Rotavirus</i> (rotavírus aviário)
AvRV-A	- <i>Avian Rotavirus specie A</i> (rotavírus aviário espécie A)
AvRV-D	- <i>Avian Rotavirus specie D</i> (rotavírus aviário espécie D)
AvRV-F	- <i>Avian Rotavirus specie F</i> (rotavírus aviário espécie F)
AvRV-G	- <i>Avian Rotavirus specie G</i> (rotavírus aviário espécie G)
dsRNA	- <i>Double stranded RNA</i> (RNA fita dupla)
EDTA	- Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGPA	- Eletroforese em gel de poliacrilamida
ELISA	- <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> (ensaio de imunoabsorção enzimática)
Hab	- Habitantes
H&E	- Hematoxilina e Eosina
IBGE	- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICTV	- <i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i> (Comitê Internacional de Taxonomia Viral)
IEP	- Índice de eficiência produtiva
IgA	- Imunoglobulina A
MAS	- <i>Malabsorption Syndrome</i>
kg	- Quilograma
NSP	- <i>Non structural proteins</i> (Proteínas não estruturais)
PBV	- Picobirnavírus
pH	- Potencial de hidrogênio
RdRp	- <i>RNA-dependent RNA polymerase</i>
RNA	- <i>Ribonucleic acid</i> (Ácido ribonucleico)
rpm	- Rotação por minuto
RSS	- <i>Runting Stunting Syndrome</i>
RT	- <i>Reverse transcription</i> (transcrição reversa)
RV	- Rotavírus
PAGE	- <i>Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
PEI	- <i>Productive Efficiency Index</i>
PCR	- <i>Polymerase Chain Reaction</i> (reação em cadeia da polimerase)
PNSA	- Programa Nacional de Sanidade Avícola
SDS	- Sódio dodecil sulfato
SMA	- Síndrome da Má Absorção
TBE	- Tris, ácido Bórico e ácido etilenodiamino tetra-acético
TERV	- Tampão de estabilização de rotavírus
µg	- Micrograma
µL	- Microlitro
VP	- <i>Viral protein</i> (Proteína viral)

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

- Figura 1** - Mapa do estado do Paraná classificado em mesorregiões, estratificado pelo total efetivo de galináceos/cabeça.....18
- Figura 2** - A: Perfil de migração eletroforética dos onze segmentos do genoma RNA de fita dupla (dsRNA) do rotavírus A bovino, e as respectivas proteínas virais. B: Representação esquemática da estrutura viral do rotavírus.....21
- Figura 3** - Esquema representativo dos eletroferogramas característicos dos rotavírus de A a G de acordo com a espécie animal.....22
- Figura 4** - Perfis eletroforéticos dos segmentos de dsRNA das espécies A, D, F e G de rotavírus aviário em gel de poliacrilamida impregnado com nitrato de prata.....22

CAPÍTULO 1

Figura 1 - Eletroforese em gel de poliacrilamida seguida pela coloração por nitrato de prata de ácidos nucleicos extraídos de conteúdo entérico de frangos de corte refugos dos aviários comerciais de Palotina, PR (fevereiro a outubro de 2015). As chaves representam o número de segmentos genômicos de acordo com o perfil de migração eletroforética das espécies de AvRV. Painel A: Canaletas 1 e 9: Controle positivo RVA bovino (padrão 4:2:3:2); Canaletas 4 e 7: eletroferogrupo de AvRV-A (padrão 5:1:3:2); Canaletas 2 e 8: eletroferogrupo AvRV-D (padrão 5:2:2:2); Canaletas 3 e 5: eletroferogrupo AvRV-F (padrão 4:1:2:2:2); Canaleta 6 (*): eletroferogrupo inconclusivo. Painel B: Canaleta 1: eletroferogrupo AvRV-A; Canaleta 2: Picobirnavírus (PBV).....45

Figura 2 - Alterações histológicas detectadas no intestino delgado de frangos de corte refugio infectados pelo rotavírus aviário (AvRV). (A) Lesões acentuadas de espessamento, atrofia e fusão de vilos, e abscesso de cripta (*), na porção P1 (duodeno medial) de frango de 14 dias; AvRV-A positiva; relação vilo/cripta de 5,7 μm ; aumento 6x. (B) Presença leve de células apoptóticas (seta) na porção P1 (duodeno medial) de frango de 14 dias; AvRV-D positiva; aumento 40x. (C) Lesões acentuadas de atrofia e fusão de vilos com presença de granulócitos (seta), e abscesso de cripta (*) na porção P3 (jejuno adjacente ao vestígio do saco vitelínico) em frango de 7 dias; AvRV-D positiva; relação vilo/cripta de 1,7 μm ; aumento 20x. (D) Infiltrado inflamatório acentuado na lâmina própria (seta) na porção P2 (jejuno medial) de ave de 9 dias; AvRV-F positiva, aumento 40x. Secção em parafina, H&E.....48

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

- Tabela 1** - Caracterização dos lotes e amostras coletadas de aviários de frangos de corte do município de Palotina, PR41
- Tabela 2** - Distribuição das espécies de AvRV e PBV detectadas em amostras de conteúdo entérico de aves refugos de acordo com o índice de eficiência produtiva (IEP) dos lotes de aviários do município de Palotina, PR.....46
- Tabela 3** - Distribuição da frequência de diagnóstico de AvRV pela técnica de EGPA em frangos de corte refugos de acordo com a classificação do índice de eficiência produtiva (IEP) dos lotes de aviários do município de Palotina, PR.....47
- Tabela 4** - Médias de comprimento de vilo (μm), profundidade de cripta (μm) e relação vilo/cripta (μm) dos três segmentos do intestino delgado (P1, P2, P3) de frangos de corte refugos e controle, estratificados em duas faixas etárias (7-9 e 13-14 dias).....50

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
3 REFERÊNCIAS.....	29
4 OBJETIVOS	37
4.1 Objetivo geral.....	37
4.2 Objetivos específicos	37
5 CAPÍTULO 1 – ROTAVÍRUS AVIÁRIO: OCORRÊNCIA, CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL ELETROFORÉTICO E AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E MORFOMÉTRICA EM FRANGOS DE CORTE NATURALMENTE INFECTADOS.	38
Resumo	38
5.1 Introdução.....	39
5.2 Material e métodos	40
5.2.1 Local do estudo	40
5.2.2 Lotes aviários e aves.....	40
5.2.3 Coleta de amostras	41
5.2.4 Processamento laboratorial.....	42
5.2.5 Análise estatística	43
5.2.6 Bioética	43
5.3 Resultados.....	44
5.3.1 Detecção de AvRV por EGPA.....	44
5.3.2 Avaliação histopatológica.....	47
5.3.3 Avaliação morfométrica e estatística.....	48
5.4 Discussão	51
5.5 Conclusão.....	56
5.6 Referências.....	57
6 CONCLUSÕES GERAIS.....	63
7 APÊNDICES.....	64

1 INTRODUÇÃO GERAL

A indústria de frango de corte tem significativa importância econômica no agronegócio brasileiro, no qual o Brasil se mantém como maior exportador de carne de frango, e tendo obtido em 2015 o título de segundo maior produtor mundial. Atualmente, a região sul é responsável por 63,46% da produção nacional, e o estado do Paraná é o maior produtor e exportador de carne de frango (APBA, 2016; BELUSSO e HESPANHOL, 2010).

Apesar dos avanços na tecnificação, nutrição e manejo, a intensificação da produção encontra constantes desafios sanitários. Diversas doenças podem acometer as aves de produção, porém as infecções entéricas e respiratórias são as mais relatadas, principalmente nas duas primeiras semanas de idade, afetando direta ou indiretamente a produção avícola (BERCHIERI et al., 2009).

As infecções intestinais podem ser determinadas por protozoários, bactérias, micotoxinas e vírus (BERCHIERI et al., 2009). Dentre os vírus entéricos, o rotavírus (RV) têm sido descrito em diferentes espécies de aves de produção, tais como: perus (PANTIN-JACKWOOD et al., 2007; YASON e SCHAT, 1987), faisões (URSU et al., 2009), frangos de corte (MCNULTY et al., 1984b ; OTTO et al., 2012), poedeiras (KARIM et al., 2007) e matrizes (METTIFOGO et al., 2014; VILLARREAL, 2006). No Brasil, a primeira identificação de rotavírus aviário (AvRV) foi realizada por Alfieri et al. (1989) em amostras de excretas de frangos de corte com manifestações clínicas de enterite, depressão e anorexia. Atualmente o AvRV está disseminado em plantéis de frango de corte do Brasil, ocasionando aumento da conversão alimentar, redução do ganho de peso, diarreia, e desenvolvimento retardado das penas (ALFIERI et al., 2000; RIOS et al., 2012; TAMEHIRO et al., 2003). Além disso, trabalhos recentes têm associado o AvRV como potencial causador ou cofator na síndrome da má absorção (SMA), caracterizada por deficiência no crescimento, desenvolvimento retardado das penas e diarreia, levando à desuniformidade do lote, aumento dos índices de refugagem e mortalidade, ocasionando constantes perdas econômicas na produção (OTTO et al., 2006; REBEL et al., 2006; SAIF et al., 2008).

Entre as técnicas laboratoriais mundialmente utilizadas para a detecção e a identificação do RV, está a eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA), onde a grande quantidade de partículas virais excretadas no período agudo da infecção, associada ao aspecto segmentado do genoma do RV, permite sua classificação pelas diferenças de migração dos segmentos genômicos (ESTES e KAPIKIAN, 2007).

Devido a importância econômica da região oeste do Paraná na produção de frango de corte no cenário nacional, estudos que determinem a ocorrência do AvRV e fatores associados são essenciais para elucidar a epidemiologia da rotavirose aviária e promover ações de controle e profilaxia em plantéis avícolas comerciais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A produção de frango de corte no Brasil tem grande representatividade no cenário econômico do país. Em 2015, a produção brasileira de carne de frango atingiu a marca de 13,14 milhões de toneladas. A produção é 67,3% absorvida pelo mercado interno onde o consumo *per capita* atingiu 43,25 kg/Hab em 2014 (ABPA, 2016). Os outros 32,7% de carne de frango abatida são destinados ao mercado externo, o que mantém o país, desde 2004, como o maior exportador de carne de aves. Em 2015, o Brasil foi classificado como o segundo maior produtor mundial, atrás apenas dos Estados Unidos (APBA, 2016; USDA, 2015(a,b)). Os fatores que permitem a constante expansão da avicultura industrial e mantêm o Brasil nesse patamar incluem políticas agrícolas, acesso aos mercados consumidores, aptidão dos produtores, condições de transporte e alta disponibilidade de milho e soja (BELUSSO e HESPANHOL, 2010).

Desde 1970, com o início das exportações brasileiras de carne de frango, a avicultura industrial se desenvolveu e expandiu de forma tecnificada, principalmente com investimentos em genética e nutrição animal. A necessidade de alta produção, em conformidade com os abatedouros, consolidou um manejo integrado, sobretudo junto às cooperativas agrícolas (BELUSSO e HESPANHOL, 2010; RIOS et al., 2012).

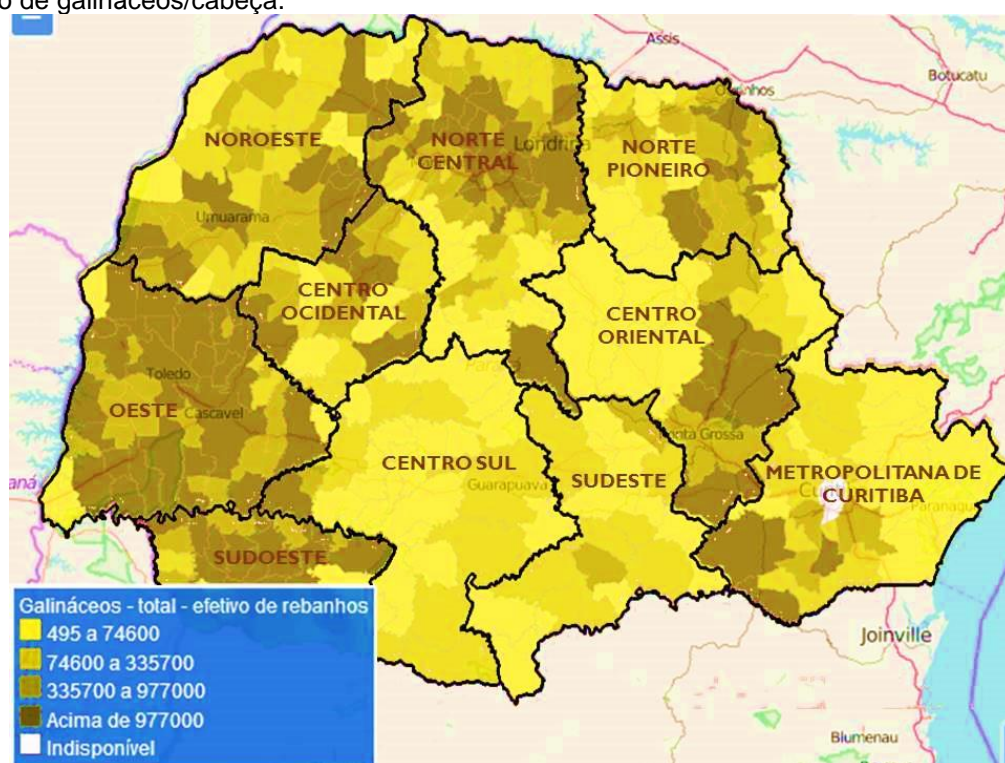
A região sul do Brasil destaca-se no cenário produtivo avícola; o estado do Paraná com 32,46%; seguido por Santa Catarina com 16,24%; e Rio Grande do Sul com 14,13%. Esses três estados são responsáveis por 62,83% da produção nacional e representam 76,6% da taxa de exportação nacional de carne de frango (ABPA, 2016).

Atualmente o Paraná é o maior estado produtor e exportador, gerando direta e indiretamente mais de 660 mil postos de trabalho. Em 2015, a maior parcela da produção de frango, equivalente a 30,68%, foi proveniente da mesorregião oeste do estado, que se destaca pela forte presença de indústrias abatedoras organizadas na forma de cooperativas agrícolas (ABPA, 2016; BELUSSO e HESPANHOL, 2010; SINDIAVIPAR, 2015). A alta disponibilidade de matérias primas (milho e soja), a consolidação das empresas cooperativas e

a demanda por parte dos agricultores, que buscam um complemento de renda através da diversificação da produção, constituem aspectos favoráveis para o constante desenvolvimento da avicultura industrial na região oeste do Paraná (BELUSSO e HESPANHOL, 2010).

O oeste paranaense engloba os municípios de Palotina, Toledo, Assis Chateaubriand, Nova Aurora e Cascavel, classificados entre os dez municípios com maior concentração de aves comerciais do estado (Figura 1). O município de Palotina possui 7.250.000 cabeças no total efetivo de galináceos, e quando comparado com outros municípios do estado, é o segundo com maior concentração de aves, atrás apenas da cidade de Cianorte situada na região noroeste do estado (IBGE, 2014; IPARDES, 2012).

Figura 1 - Mapa do estado do Paraná classificado em mesorregiões, estratificado pelo total efetivo de galináceos/cabeça.



Fonte: IBGE, 2014 (Adaptado)

Entretanto, com a intensificação da produção, associada às condições ambientais e às práticas de manejo, também se elevam os desafios sanitários, favorecendo a ocorrência de enfermidades economicamente significativas para o setor avícola. Os distúrbios entéricos, juntamente com os respiratórios, são os problemas que mais contribuem para a queda no desempenho produtivo e no rendimento de carcaça (BARNES et al., 2000; BELUSSO e HESPANHOL,

2010; SAIF et al., 2008). A presença e ação de agentes infecciosos no sistema digestório afeta diretamente a absorção dos nutrientes. Nas aves comerciais, as enterites são observadas principalmente no primeiro mês de idade. No entanto, a causalidade das enterites é bastante complexa, pois além dos fatores antinutricionais presentes, vários patógenos podem estar envolvidos em infecções singulares ou mistas (BERCHIERI et al., 2009; MCNULTY e REYNOLDS, 2008)

A síndrome da má absorção (SMA) é o termo utilizado para designar as enfermidades infecciosas entéricas que acometem principalmente os frangos de corte de 1 a 3 semanas de idade. As elevadas perdas econômicas da SMA em um plantel são decorrentes das elevadas taxas de conversão alimentar, mortalidade e desuniformidade do lote, redução do ganho de peso, e maior suscetibilidade à infecções secundárias (KANG et al., 2012). Por não estar associada a uma única etiologia, o reconhecimento da SMA é baseado em termos descritivos conferindo-lhe outras denominações como síndrome da desuniformidade tardia (*Runting Stunting Syndrome; RSS*); doença entérica ; síndrome do refugio fisiológico ou refugagem; síndrome do pássaro pálido; doença da pena de helicóptero; síndrome da cloaca suja; síndrome do nanismo (*Stunting Syndrome*); e síndrome do raquitismo (GUY, 1998; REBEL et al., 2006).

Diferentes bactérias, protozoários, micotoxinas e vírus já foram detectados em animais com manifestações da SMA. Entre os vírus entéricos das galinhas, já foram descritos como prováveis agentes etiológicos da SMA, o adenovírus, reovírus, parvovírus, coronavírus, astrovírus e rotavírus (HAUCK et al., 2016; KANG et al., 2012; OTTO, et al., 2006; ZSACK, CHA e DAY, 2013). Entretanto, o papel exato destes vírus na SMA ainda é pouco compreendido, visto que também já foram detectados e isolados de aves clinicamente saudáveis. Estas constatações têm sugerido a multifatorialidade na etiologia da SMA, incluindo a interação de mais de um patógeno com outros fatores não infecciosos.

O Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA), consolidado através da Portaria nº 193, de 19/09/1994 do Ministério da Agricultura Pecuária e

Abastecimento, objetiva a fiscalização e controle da sanidade avícola do país quanto ao controle e prevenção da salmonelose, micoplasmose, doença de Newcastle e influenza aviária (BRASIL, 1994). No entanto, embora haja inúmeros relatos de ocorrência de enteropatógenos virais em frangos de corte comercial, dados oficiais ou normativas que determinem o controle ou diagnóstico são inexistentes (DAY e ZSAK, 2013).

O AvRV já foi descrito por diversos autores como patógeno primário e complicante de enterite em aves comerciais como frango de corte e postura, e inclusive em perus e faisões (DECAESSTECKER et al., 1986; JINDAL et al., 2009; MCNULTY et al., 1981; 1983; 1984; SPACKMAN et al., 2010; THEIL e SAIF, 1987; YASON e SCHAT, 1987). Estudos recentes também têm sugerido a possibilidade de um papel primário do AvRV na etiologia da SMA (BERCHIERI et al., 2009; GUY et al., 1998; JINDAL et al., 2009; MCNULTY e REYNOLDS, 2008; OTTO et al., 2006; 2012; RIOS et al., 2012; VILLARREAL, 2006).

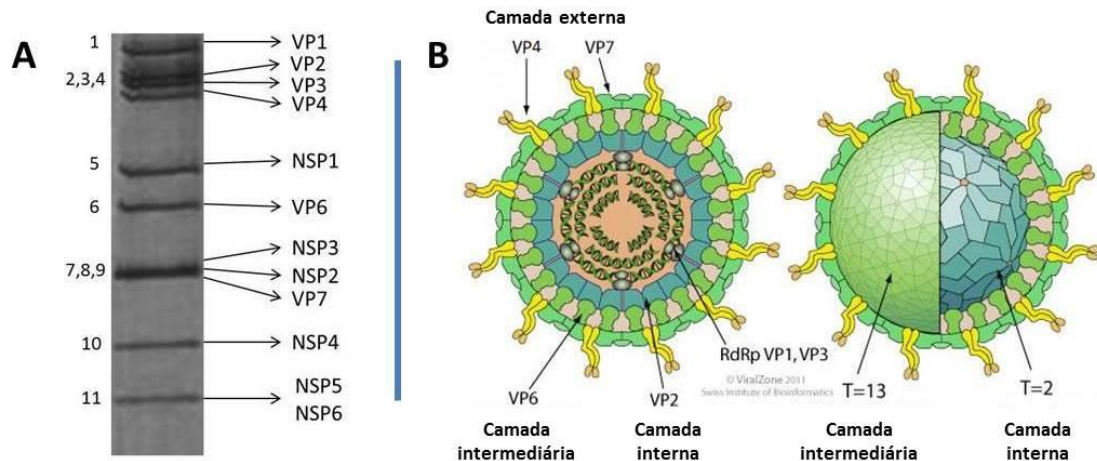
O rotavírus é o principal agente viral causador de diarreia em diferentes espécies animais no mundo. O rotavírus pertence à família *Reoviridae*, subfamília *Sedoreovirinae*, gênero *Rotavirus*, onde estão incluídas oito espécies designadas pelas letras A a H (ESTES e KAPIKIAN, 2007; ICTV, 2014; MARTELLA et al., 2010). Destas, as espécies A, D, F e G acometem as aves, sendo as três últimas exclusivas de aves (ESTES e KAPIKIAN, 2007).

O vírion, desprovido de envelope lipoproteico, formado por três camadas proteicas concêntricas de simetria icosaédrica, denominadas camada interna, intermediária e externa que circundam o genoma viral constituído por onze segmentos de RNA fita dupla (dsRNA). Estes onze segmentos codificam doze proteínas virais, sendo seis proteínas estruturais “*viral protein - VP*”, e seis proteínas não estruturais “*non structural protein - NSP*” (Figura 2-A) (ALFIERI et al., 2007; ESTES e KAPIKIAN, 2007).

As proteínas estruturais (VP) formam as três camadas do capsídeo viral. A camada interna ou *core* é composta pelas proteínas VP1, VP2 e VP3. A cama intermediária, constituída pela proteína VP6, que permite a classificação antigênica do rotavírus em espécies, seja pela reatividade de anticorpos

monoclonais anti-VP6 ou pelo sequenciamento genômico do gene VP6. A camada externa é composta pelas proteínas VP4 e VP7, responsáveis pela interação inicial do vírus com a célula hospedeira (Figura 2-B) (ALFIERI et al., 2007; ESTES e KAPIKIAN, 2007).

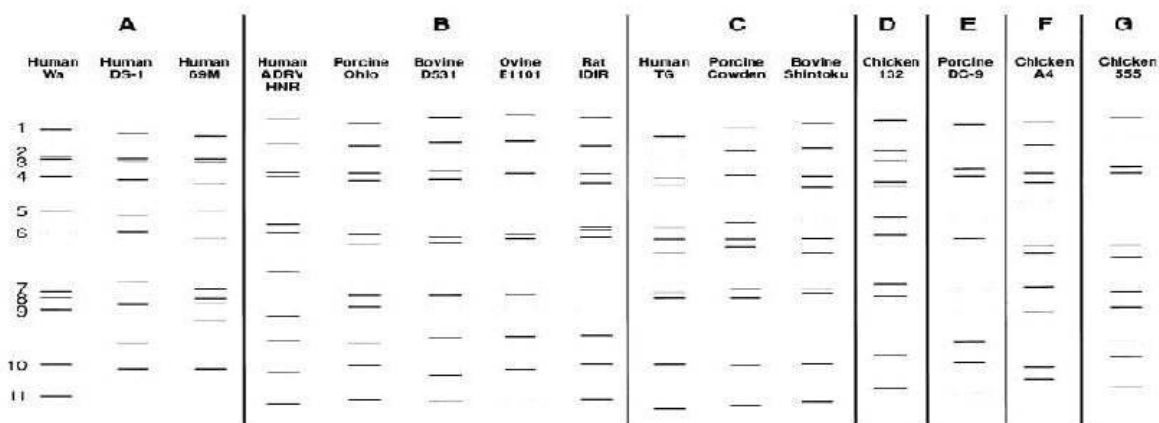
Figura 2 - A: Perfil de migração eletroforética dos onze segmentos do genoma RNA de fita dupla (dsRNA) do rotavírus A bovino, e as respectivas proteínas virais. B: Representação esquemática da estrutura viral do rotavírus.



Fonte: (B) Viral Zone, 2011 (Adaptado).

A característica segmentada do genoma dos rotavírus permite uma classificação baseada no padrão eletroforético quando o dsRNA viral é submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA). De acordo com o tamanho molecular dos segmentos genômicos são definidas quatro classes de migração eletroforética na espécie RV-A: classe I (segmentos 1,2,3 e 4), classe II (5 e 6), classe III (7,8 e 9) e classe IV (10 e 11). O padrão eletroforético permite a classificação das espécies de rotavírus pelo perfil de mobilidade eletroforética, onde cada espécie apresenta uma típica distribuição dos seus segmentos (Figura 3) (ESTES e KAPIKIAN et al., 2007).

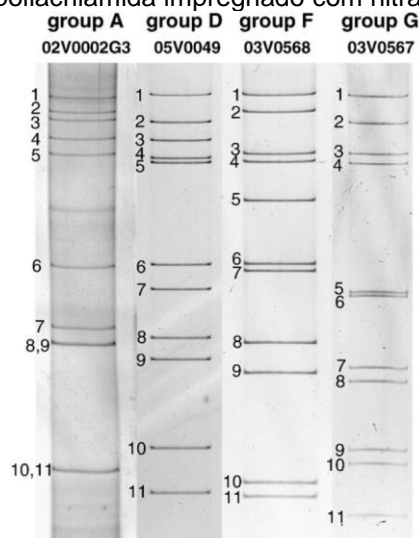
Figura 3 - Esquema representativo dos eletroferogramas característicos dos rotavírus de A a G de acordo com a espécie animal.



Fonte: KAPIKIAN e CHANOCK (2001) (Adaptado).

O perfil de migração eletroforética dos segmentos de dsRNA das espécies de AvRV apresenta a seguinte distribuição: AvRV-A (5:1:3:2); AvRV-D (5:2:2:2); AvRV-F (4:1:2:2:2); AvRV-G (4:2:2:3) (Figura 4) (ESTES e KAPIKIAN, 2007).

Figura 4 - Perfis eletroforéticos dos segmentos de dsRNA das espécies A, D, F e G de rotavírus aviário em gel de poliacrilamida impregnado com nitrato de prata.



Fonte: OTTO et al. (2012).

Em aves, a infecção pelo AvRV pode se apresentar de forma clínica ou subclínica. Entre os fatores que podem afetar o desencadeamento ou não das manifestações clínicas, inclui a presença de IgA anti-rotavírus no trato intestinal, dose infectante, virulência da cepa, a idade da ave e co-infecção com diferentes espécies de AvRV ou outros enteropatógenos (KARIM et al., 2007a; YASON e SCHAT, 1987).

Infecções experimentais demonstraram que aves de 1 até 28 dias são igualmente suscetíveis à infecção pelo AvRV (MCNULTY et al., 1983). Entretanto, a detecção de AvRV é relatada com maior frequência em amostras fecais de aves com um a quinze dias de idade (ALFIERI et al., 2000; ISLAM et al., 2009; KARIM et al., 2007a,b; MASCARENHAS et al., 2016; TAMEHIRO et al., 2003; THEIL e SAIF, 1987).

A transmissão ocorre principalmente pela via fecal-oral, através da ingestão de água, alimentos, ou da cama de aviário contaminada com excretas de aves infectadas (ALFIERI et al., 2000; MCNULTY e REYNOLDS, 2008; MCNULTY et al., 1984). Há relatos de que possa ocorrer a transmissão por vetores mecânicos como as larvas do coleóptero *Alphitobius diaperinus* e outros insetos comumente presentes na cama dos aviários comerciais (DESPINS et al., 1994). A transmissão vertical não foi comprovada, porém com o relato de diagnóstico de AvRV em perus de três dias de idade, foi sugerida uma possível transmissão transovariana ou contaminação via casca do ovo (MCNULTY et al., 1984; THEIL e SAIF, 1987).

Devido à alta resistência da partícula viral às condições adversas do trato gastrointestinal, como o pH ácido e as enzimas proteolíticas, o AvRV consegue atingir o epitélio do intestino delgado onde estabelece a infecção e replicação nos enterócitos maduros das vilosidades (MCNULTY e REYNOLDS, 2008). Após a penetração do vírus por endocitose, inicia-se o ciclo replicativo no citoplasma dos enterócitos, culminando com a lise celular e liberação de virions aptos para infectar novos enterócitos maduros (ALFIERI et al., 2000; MCNULTY e REYNOLDS, 2008; RAMIG, 2004; RUIZ et al., 2009).

A destruição dos enterócitos apicais resulta em diarreia por má absorção, tanto de água como de nutrientes, além de reduzir a secreção de dissacaridases, o que prejudica a absorção dos dissacarídeos da dieta e reduz a disponibilidade energética às aves. Após um curto período de incubação de dois a cinco dias, em aves comerciais o AvRV pode variar de manifestações subclínicas a enterite grave. Podem ser observadas manifestações como desidratação, anorexia, ingestão de cama de aviário, e sinais de desequilíbrio entérico como diarreia associada a cloaca e pés sujos com excretas aderidas,

e maior umidade na cama (ALFIERI et al., 2000; DHAMA et al., 2015; GUY, 1998).

O pico de excreção viral ocorre de dois a cinco dias pós-infecção, podendo se prolongar até 16 dias. Em decorrência da grande injúria tecidual, as criptas intestinais realizam a reposição celular com células cubóides, imaturas morfológica e fisiologicamente (MCNULTY e REYNOLDS, 2008; TAMEHIRO et al., 2007). As células cubóides são refratárias à infecção pelo rotavírus o que determina a característica auto limitante da infecção, porém com reduzidas capacidades absorptivas e digestivas dos nutrientes (ALFIERI et al., 2000; 2007; BERCHIERI et al., 2009; MCNULTY e REYNOLDS, 2008; RAMIG, 2004).

Os achados de necropsia mais evidentes nas enterites envolvendo o AvRV são aumento de fluido e gás, palidez e perda do tônus no intestino delgado e ceco, erosões amarronzadas no duodeno e jejuno. Nos achados histopatológicos a superfície das vilosidades se apresenta reduzida, rugosa e desuniforme com descamação e vacuolização basal dos enterócitos, alargamento da lâmina própria com infiltração linfocitária e polimorfonuclear (BERCHIERI et al., 2009; DHAMA et al., 2015). Alterações histopatológicas no intestino delgado em infecções experimentais com AvRV-A podem ser mais intensas no duodeno que no jejuno (HAYNES et al., 1994; MCNULTY et al., 1983). Otto et al. (2006) demonstraram um maior número de lesões nas porções do jejuno e íleo relacionadas à infecção com AvRV-D, bem como maior gravidade e maior associação com a SMA. Além disso, a co-infecção por duas espécies de AvRV com tropismo por diferentes porções do intestino constitui um fator complicante e frequente a campo, intensificando a gravidade da infecção (BERCHIERI et al., 2009; DHAMA et al., 2015; MCNULTY e REYNOLDS, 2008; MCNULTY et al., 1983; OTTO et al., 2006).

As espécies A, D, F e G de AvRV já foram isoladas de diferentes espécies de aves, sendo as espécies D, F e G exclusivas de aves (DAY e ZSACK, 2013; ESTES e KAPIKIAN, 2007; MCNULTY e REYNOLDS, 2008). Os trabalhos de prevalência têm demonstrado uma maior frequência de ocorrência

envolvendo as espécies AvRV-A e AvRV-D (HAYNES et al., 1994; KARIM et al., 2007b; KATTOOR et al., 2013; OTTO et al., 2012)

O primeiro relato de infecção por AvRV foi em 1977 por Bergeland et al. (1977), a partir da análise do conteúdo entérico de perus. Desde então, vários relatos indicam o AvRV como agente amplamente disseminado em plantéis de frango de corte comerciais na Escócia, Alemanha, Reino Unido, Polônia, Suécia, Itália, França, Holanda, Bélgica, Bangladesh, Índia, China, Japão, Estados Unidos, Cuba, Brasil e Argentina (BESERRA et al., 2014; DAY et al., 2013; JINDAL et al., 2012; KARIM et al., 2007b; MCNULTY et al., 1983; MCNULTY e REYNOLDS, 2008; MCNULTY et al., 1979; OTTO et al., 2006; 2012; PANTIN-JACKWOOD et al., 2007; SAIF et al., 2008; SPACKMAN et al., 2010).

No Brasil, o AvRV foi identificado pela primeira vez por Alfieri et al. (1989), em frangos de corte com sinais clínicos de diarreia. Posteriormente, estudos envolvendo diferentes estados (RS, SC, PR, SP, MG, GO, RJ, BA, CE, PA), demonstraram que a frequência de detecção do AvRV em frangos de corte variou entre 7,7% e 54,3% (ALFIERI et al., 1989; BELLO, 2010; BESERRA, 2013; BESERRA et al., 2014a,b; BEZERRA, 2012; BEZERRA et al., 2012; 2014; MASCARENHAS et al., 2016; METTIFOGO et al., 2014; RIOS, 2010; RIOS et al., 2012; SILVA et al., 2013; TAMEHIRO et al., 2003; VILLARREAL, 2006). Esta discrepância pode ser atribuída às diferentes metodologias empregadas, tanto de amostragem (natureza da amostra, idade das aves, condição clínica) quanto das técnicas analíticas (EGPA, ELISA, RT-PCR, microscopia eletrônica de transmissão, cultivo celular). A maioria dos estudos realiza a coleta em forma de *pool* de excretas para diagnóstico de AvRV. No entanto, isto pode reduzir drasticamente as chances de detecção do vírus, principalmente quando são aplicados métodos de diagnósticos pouco sensíveis como a EGPA (BEZERRA et al., 2012; MASCARENHAS et al., 2016).

As espécies de AvRV de maior ocorrência no Brasil são AvRV-A e AvRV-D com frequências de 35 a 53% (BESERRA et al., 2014a; BEZERRA, 2012; BEZERRA et al., 2012; BEZERRA et al., 2014; SILVA et al., 2013). As

espécies AvRV-F e AvRV-G também já foram relatadas em frangos de corte, porém com menor frequência (9,4 – 18,5%) utilizando a RT-PCR (BESERRA et al. 2014b, MASCARENHAS et al., 2016).

Contudo, dados relativos à morbidade e as taxas de refugagem bem como os prejuízos econômicos na avicultura industrial ocasionados pelo AvRV, ainda são escassos no país (ALFIERI et al., 2000; BELLO, 2010; BEZERRA et al., 2012; BESERRA et al., 2014a,b; RIOS et al., 2012; SILVA et al., 2013; TAMEHIRO et al., 2003; VILLARREAL, 2006; VILLARREAL et al., 2006).

Entre as técnicas disponíveis para diagnóstico direto de RV, incluem a microscopia eletrônica, isolamento viral em cultivo celular, ELISA direto, EGPA, RT-PCR e suas variações. Destas, as mais utilizadas na rotina diagnóstica são a EGPA e a RT-PCR. A baixa complexidade de execução associada à especificidade e/ou sensibilidade destas técnicas, constituem as principais vantagens para utilização na rotina laboratorial (ESTES e KAPIKIAN, 2007; DHAMA et al., 2015).

A grande quantidade de partículas virais excretadas no período agudo da infecção, associado ao aspecto segmentado do genoma do RV, permite a aplicação da técnica de EGPA para a identificação desse vírus. O dsRNA genômico pode ser extraído de partículas virais semi-purificadas e separado de acordo com as massas moleculares e a velocidade de migração, utilizando-se a técnica de EGPA que permite a visualização da variabilidade eletroforética pelo perfil de migração, permitindo traçar um perfil epidemiológico molecular das espécies de RV circulantes (GUY, 1998; OTTO et al., 2012; TAMEHIRO et al., 2003).

A EGPA oferece simplicidade, economia e rapidez no diagnóstico de RV (HERRING et al., 1982; PEREIRA et al., 1983b). Porém, a classificação de uma espécie baseada na análise de migração do dsRNA é complexa pela possibilidade de rearranjos genômicos, coinfeções com outros vírus segmentados como picobirnavírus (PBV) e reovírus, ou ainda infecções mistas de RV (DESSELBERGER, 1996; JOHNE et al., 2011; TODD e MCNULTY., 1986). Portanto, os métodos de amplificação genômica são amplamente utilizados para confirmar a classificação das espécies de RV detectadas na

EGPA, apresentando maior especificidade e sensibilidade quando comparada à EGPA (ASANO et al., 2011; MATTHIJNSSENS et al., 2010; MCNULTY et al., 1984; OTTO et al., 2006; PEREIRA et al., 1983a,b; SCHUMANN et al., 2009; TODD et al., 1980; TROJNAR et al., 2009; URSU et al., 2009).

A persistência do AvRV mesmo em propriedades altamente tecnificadas é favorecida por diversos fatores, tais como: alta concentração de partículas virais excretadas no período agudo da doença (10^{10} a 10^{12} partículas virais/grama de excretas); resistência dos virions às condições ambientais e aos produtos químicos utilizados em desinfecção; presença de infecções subclínicas e de adultos portadores assintomáticos; possibilidade de transmissão entre espécies (infecções heterólogas), e caráter endêmico da infecção (ALFIERI et al., 2000; BERCHIERI et al., 2009; MCNULTY e REYNOLDS, 2008).

Na avicultura industrial, o vazio sanitário e a reutilização da cama de aviário; a limpeza e desinfecção das instalações e equipamentos; e as políticas de biossegurança entre os núcleos de criação constituem aspectos críticos para a manutenção do padrão higiênico-sanitário (BERCHIERI et al., 2009; DINIZ et al., 2015). Assim, uma maior interação do controle ambiental e higiênico-sanitário do plantel torna-se imprescindível para mitigar os sinais clínicos e reduzir a transmissão horizontal (BERCHIERI et al., 2009; TAMEHIRO et al., 2003; SCHUMANN et al., 2009).

Devido à grande variabilidade do AvRV bem como a dificuldade no isolamento de AvRV em cultivo celular, ainda não se tem um modelo de vacina utilizado comercialmente, ou tratamento específico afim de mitigar a infecção por AvRV (BERCHIERI et al., 2009; DHAMA et al., 2015). Portanto, as boas práticas de manejo quanto ao controle de temperatura, ventilação e umidade relativa do ar no interior do aviário, e na qualidade de insumos (água e ração) são requisitos fundamentais nas primeiras semanas de idade para minimizar os fatores predisponentes para a infecção. Além disso são preconizadas as medidas de biossegurança higiênico-sanitárias de rotina que previnem a maioria dos transtornos à saúde das criações avícolas, tais como o descarte de aves refugos e com sinais clínicos de enterite, manejo *all in/all out*, respeito ao

tempo de vazio sanitário, limpeza e desinfecção das instalações e equipamentos, manejo de reutilização da cama respeitando o tempo de fermentação e controle de pragas (ALFIERI et al., 2000; 2007; BERCHIERI et al., 2009; MCNULTY et al., 1984; TAMEHIRO et al., 2003; ZAVALA, 2006).

3 REFERÊNCIAS

- ABPA – Associação Brasileira de Proteína Animal. **Relatório anual, 2015**. Disponível em: <http://abpabr.com.br/files/RelatorioAnual_UBABEF_2015_DIGITAL.pdf> Acesso em: 22 setembro de 2015.
- ALFIERI, A.A.; ALFIERI, A.F.; TAKIUCHI, E.; LOBATO, Z.I.P. Reoviridae. In: FLORES, E.F. (Org.). **Virologia Veterinária**. 1 ed. Santa Maria: Editora UFSM, 2007. p.775-807.
- ALFIERI, A.F.; RESENDE, M.; RESENDE, J.S.; ALFIERI, A.A. Atypical rotavirus infections among broiler chickens in Brazil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*.v. 41. p. 81–82. 1989. In: TAMEHIRO, C.Y.; ALFIERI, A.F.; MÉDICI, K.C.; ALFIERI, A.A. Segmented double stranded genomic RNA viruses in fecal samples from broiler chicken. **Brazilian Journal of Microbiology**,v.34, n.4, p.344-348, 2003.
- ALFIERI, A.F.; TAMEHIRO, C.Y.; ALFIERI, A.A. Vírus entéricos RNA fita dupla, segmentado, em aves: Rotavírus, Reovírus e Picobirnavírus. **Semina: Ciências Agrárias**, v.21, n.1, p.101-103, 2000.
- ASANO, K.M.; GREGORI, F.; SOUZA, S.P.; ROTAVA, D.; OLIVEIRA, R.N.; VILLARREAL, L.Y.B.; RICHTZENHAIN, L.J.; BRANDÃO, P.E. Bovine Rotavirus in Turkeys with Enteritis. **Avian Diseases**, v.55, n.4, p.697-700, 2011.
- BARNES, H.J.; GUY, J.S.; VAILLANCOURT, J.P. Poultry enteritis complex. **Scientific and Technical Review OIE**, v.19, n.2, p.565-588, 2000.
- BELLO, C.P. **Deteção molecular e diagnóstico diferencial de vírus entéricos em aves comerciais**. 2010. 60f. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Patologia, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2010.
- BELUSSO, D.; HESPANHOL A.N. A evolução da avicultura industrial brasileira e seus efeitos territoriais. **Revista Percorso - NEMO**. Maringá. v.2, n.1, p.25-51, 2010.
- BERCHIERI, A.; SILVA E.N.; DIFÁBIO, J.; SESTI, L.; ZUANAZE, M.A.F. Reovirose e Rotavirose – Adenovirose, reovirose, rotavirose e virose intestinais. **Doença das aves**. 2ed.Campinas: Fundação APINCO de ciência e tecnologia avícolas. 2009. Cap 5.6.
- BESERRA, L.A.R.; BARBOSA, B.R.P.; BERNARDES, N.T.C.G.; BRANDÃO, P.E.; GREGORI, F. Occurrence and characterization of rotavirus A in broilers , layers , and broiler breeders from Brazilian poultry farms. **Avian diseases**, v.58, n.1, p.153-157, 2014a.

BESERRA, L.A.R.; BARBOSA, B.R.P.; BERNARDES, N.T.C.G.; BRANDÃO, P.E.; GREGORI, F. Research Note — Description of rotavirus F in broilers from Brazilian poultry farms. **Avian Diseases**, v.1, n.3, p.458-461, 2014b.

BESERRA, L.A.R. **Ocorrência e caracterização de rotavírus em frangos de corte, poedeiras e matrizes de criações comerciais brasileiras**. 2013. 119f. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2013.

BEZERRA, D.A.M.; SILVA, R.R.; KAIANO, J.H.L.; SILVESTRE, R.V.D.; OLIVEIRA, D.S.; LINHARES, A.C.; GABBAY, Y.B.; MASCARENHAS, J.D.P. Detection of avian group D rotavirus using the polymerase chain reaction for the VP6 gene. **Journal of Virological Methods**, v.185, p.189-192, 2012.

BEZERRA, D.A.; DA SILVA, R.R.; KAIANO, J.H.; DE SOUZA OLIVEIRA, D.; GABBAY, Y.B.; LINHARES, A.C.; MASCARENHAS, J.D. Detection, epidemiology and characterization of VP6 and VP7 genes of group D rotavirus in broiler chickens. **Avian Pathology**, v.43, n.3, p.238–243, 2014.

BEZERRA, D.A.M. **Ocorrência de rotavírus do grupo D em aves criadas em granjas na mesorregião metropolitana de Belém, Pará**. 2012. 68f. Dissertação (mestrado) – Núcleo de Medicina Tropical, Universidade Federal do Pará, Belém. 2012.

BERGELAND, M.E.; MCADARAGH, J.P.; STOTZ, I. Rotaviral enteritis in turkey poult. Proc 26th West Poult Dis Conf. p. 129-130 1977. In: ALFIERI, A.F.; TAMEHIRO, C.Y.; ALFIERI, A.A. Vírus entéricos RNA fita dupla, segmentado, em aves: Rotavírus, Reovírus e Picobirnavírus. **Semina: Ciências Agrárias**, v.21, n.1, p.101-103, 2000.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Portaria nº 193, de 19 de setembro de 1994. Institui o Programa Nacional de Sanidade Avícola no âmbito da SDA e cria o Comitê Consultivo do Programa de Sanidade Avícola**. Brasília, DF, 1994.

DAY, J.M.; ZSAK, L. Recent progress in the characterization of avian enteric viruses. **Avian Diseases**, v.57, p.573–580, 2013.

DECAESSTECKER, M.; CHARLIER, G. and MEULEMANS, G. Significance of parvoviruses, entero-likeviruses and reoviruses in the aetiology of chicken mal absorption syndrome. **Avian Pathology**, v.15, p.769-782, 1986.

DESSELBERGER, U. Genome rearrangements of rotaviruses. Adv. Virus Res. 46, 69–95. 1996 In: JOHNE, R.; OTTO, P.; ROTH, B.; LOHREN, U.; BELNAP, D.; REETZ, J.; TROJNAR, E. Sequence analysis of the VP6-encoding genome segment of avian group F and G rotaviruses. **Virology**, v.412, p.384-391, 2011.

DESPINS, J.L.; AXTELL, R.C.; RIVES, D.; GUY, J.S.; FICKEN, M.D. Transmission of enteric pathogens of turkey by darkling beetle larva (*Alphitobius diaperinus*). **Journal of Applied Poultry Science**, v.3, p.61-65, 1994.

DHAMA, K.; SAMINATHAN, M.; KARTHIK, K.; TIWARI, R.; SHABBIR, M.Z.; KUMAR, N.; MALIK, Y.S.; SINGH, R. K. Avian rotavirus enteritis - an updated review. **The Veterinary quarterly**, v.35, n.3, p.142-58, 2015.

DINIZ, T.T.; MELLO, J.L.M.; GRANJA-SALCEDO, Y.T. Temperatura do ambiente e reutilização da cama no desempenho e qualidade da carne de frango. **Ciência & Tecnologia: FATEC-JB**, v.7, n.1, p.47-62, 2015.

ESTES, M.K.; KAPIKIAN, A.Z. Rotaviruses. In: Knipe, D.M.; Howley, P.M. (ed.) **Fields Virology**. 5 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. p.1917-1974.

GUY, J. Virus infections of the gastrointestinal tract of poultry. **Poultry Science**, v.77, p.1166-1175, 1998.

HAYNES, J.S.; REYNOLDS, D.L.; FAGERLAND, J.A.; SIX, A.S. Morphogenesis of enteric lesions induced by group D Rotavirus in ringneck pheasant chicks (*Ptilasianus colchicus*). **Veterinary Pathology**, v.31, p.74-81, 1994.

HAUCK, R.; GALLARDO, R.A.; WOOLCOCK, P.R.; SHIVAPRASAD, H.L. A coronavirus associated with runting stunting syndrome in broiler chickens. **Avian Diseases**, v.60, n.2, p.528-34, 2016

HERRING, A.J.; INGLIS, N.F.; OJEH, C.K.; SNODGRASS, D.R.; MENZIES, J.D. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver stained polyacrilamide gels. **Journal of Clinical Microbiology**, v.16, n.3, p.473-477, 1982.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Pecuária - 2014: Galináceos - total - efetivo de rebanhos: Comparação entre os municípios: Paraná**. 2014. Disponível em: <cod.ibge.gov.br/7JMSM> Acesso em: 30 de maio de 2016.

IPARDES - Instituto Paranaense de Desenvolvimento Econômico e Social. **Relação dos municípios segundo as regiões geográficas do Paraná**, 2012. Disponível em: <www.ipardes.gov.br/pdf/mapas/base_fisica/relacao_mun_regiao_geografica_parana.pdf> Acesso em: 19 de janeiro de 2016.

ICTV – International Committee on Taxonomy of Viruses. **Official ICTV 2014 taxonomy**. 2014. Disponível em: <www.ictvonline.org/virustaxonomy.asp> Acesso em: 28 outubro 2015.

ISLAM, M.S.; ALAM, M.M.; AHMED, M.U.; SAIFUZZAMAN, A.B.M.; KOBAYASHI, N.; KAYESH, M.E.H.; UDDIN, M.S. Molecular epidemiologic study on rotavirus infection in human and birds in association with gastroenteritis. **Bangladesh Journal Veterinary Medicine**, v.7, n.1, p.233-237, 2009.

JINDAL, N.; PATNAYAK, D.P.; ZIEGLER, A.F.; LAGO, A.; GOYAL, S.M. A retrospective study on poult enteritis syndrome in Minnesota. **Avian Diseases**, v.53, n.2, p.268-275, 2009.

JINDAL, N.; CHANDER, Y.; PATNAYAK, D.P.; MOR, S.K.; ZIEGLER, A.F.; GOYAL, S.M. A multiplex RT-PCR for the detection of astrovirus, rotavirus, and reovirus in turkeys. **Avian Diseases**, v.56, n.3, p.592–596, 2012.

JOHNE, R.; OTTO, P.; ROTH, B.; LÖHREN, U.; BELNAP, D.; REETZ, J.; TROJNAR, E. Sequence analysis of the VP6-encoding genome segment of avian group F and G rotaviruses. *Virology*, v. 412, p. 384-391, 2011.

KANG, K.; EL-GAZZAR, M.; SELLERS, H.S.; DOREA, F.; WILLIAMS, S.M.; KIM, T.; COLLETT, S.; MUNDT, E. Investigation into the aetiology of runting and stunting syndrome in chickens. **Avian Pathology**, v.41, n.1, p.41-50, 2012.

KAPIKIAN, A.Z.; HOSHINO, Y.; CHANOCK, R.M. Rotaviruses. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M.; GRIFFIN, D.E. et al. **Fields Virology**. 5ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. p.1787-1833,

KARIM M.R.; RUME, F.I.; ALAM, M.M.; AHMED, M.U.; CHOWDHURY, A.K. Survey on the distribution of avian rotavirus by polyacrylamide gel electrophoresis. **Thai Journal of Agricultural Science**, v.40, n.3-4, p.151-157, 2007a.

KARIM, M.R.; RUME, F.I.; ALAM, M.M.; AHMED, M.U. Molecular epidemiologic study on avian rotavirus prevailing in Bangladesh. **Bangladesh Journal Veterinary Medicine**, v.5, n.1&2, p.43-48, 2007b.

KATTOOR, J.J.; SHARMA, K.; KUMER, N.; BATRA, M.; JINDAL, N.; YADAV, A.S.; MALIK, Y.S. Distribution frequency of avian rotaviruses in India, 2011–2013. **Advances in Animal and Veterinary Sciences**, v.5, p.148-150, 2013.

MARTELLA, V.; BÁNYAI, K.; MATTHIJNSSENS, J.; BUONAVOGLIA, C.; CIARLET, M. Zoonotic aspects of rotaviruses. **Veterinary Microbiology**, v.140, p.246-255, 2010.

MASCARENHAS, J.D.P.; BEZERRA, D.A.M.; SILVA, R.R.; SILVA, M.J.M.; SOUSA, E.C.; SOARES, L.S. Brief report – Detection of the VP6 gene of group F and G rotaviruses in broiler chicken fecal samples from the Amazon region of Brazil. **Archives of Virology**, 2016.

MATTHIJNSSENS, J.; MARTELLA, V.; VAN RANST, M. Genomic evolution, host-species barrier, reassortment and classification of rotaviruses. **Future Virology**, v.5, n.4, p.385-390, 2010.

MCFERRAN, J.B.; MCNULTY, M.S.; MCCRACKEN, R.M.; GREENE, J. Enteritis and associated problems. 1983. In: MCNULTY, M.S., ALLAN, G.M., CONNOR, T.J., MCFERRAN, J.B. AND MCCRACKEN, R.M. An entero-like virus associated with the runting syndrome in broiler chickens. **Avian Pathology**, v.13, p.429-439, 1984.

MCNULTY M.S.; REYNOLDS, D.L. Viral enteric infections – Rotavirus infections. In: SAIF, Y.M.; FADLY, A.M.; GLISSON, J.R.; MCDUGALD, L.R.; NOLAN, L.K.; SWAYNE, D.E. **Diseases of Poultry**. 12ed. USA: Blackwell Publishing, 2008. p.329-350.

MCNULTY, M.S.; ALLAN, G.M.; TODD, D.; MCFERRAN, J.B.; MCCRACKEN, R.M. Isolation from chickens of a rotavirus lacking the rotavirus group antigen. **Journal of General Virology**, n.55, p.405-413, 1981.

MCNULTY, M.S.; TODD, D.; ALLAN, G.M.; MCFERRAN, J.B.; GREENE, J.A. Epidemiology of rotavirus infection in broiler chickens: recognition of four serogroups. **Archives of Virology**, v.81, p.113-121, 1984.

MCNULTY, M. S., G. M. ALLAN, AND R. M. MCCRACKEN. Experimental infection of chickens with rotaviruses: clinical and virological findings. **Avian Pathology**, v.12, p.45–54, 1983.

MCNULTY, M.S.; CURRAM W.L.; TODD, D.; MCFERRAN, J.B. Detection of viruses in avian faeces by direct electron microscopy. **Avian Pathology**, v.8, p. 239-247, 1979.

MCNULTY, M.S.; ALLAN, G.M.; CONNOR, T.J.; MCFERRAN, J.B.; MCCRACKEN, R.M. An entero-like virus associated with the runting syndrome in broiler chickens. **Avian Pathology**, v.13. p.429-439. 1984.

METTIFOGO, E.; NUÑEZ, L.F.N.; CHACÓN, J.L.; SANTANDER PARRA, S.H.; ASTOLFI-FERREIRA, C.S.; JEREZ, J.A.; JONES, R.C.; PIANTINO FERREIRA, A.J. Emergence of enteric viruses in production chickens is a concern for avian health. **The Scientific World Journal**, 2014.

OTTO, P.; AHMED, M.U.; HOTZEL, H.; MACHNOWSKA, P.; REETZ, J.; ROTH, B.; TROJNAR, E.; JOHNE, R. Detection of avian rotaviruses of groups A, D, F and G in diseased chickens and turkeys from Europe and Bangladesh. **Veterinary Microbiology**, v.156, p.8-15, 2012.

OTTO, P.; LIEBLER-TENORIO, E.M.; ELSCHNER, M., REETZ, J.; LOHREN, U.; DILLER, R. Detection of rotaviruses and intestinal lesions in broiler chicks from flocks with runting and stunting syndrome (RSS). **Avian Diseases**, v.50, p.411-418, 2006.

PANTIN-JACKWOOD, M.J.; SPACKMAN, E.; DAY, J.M.; RIVES, D. Periodic monitoring of commercial turkeys for enteric viruses indicates continuous presence of astrovirus and rotavirus on the farms. **Avian Diseases**, n.51, p.674-680, 2007.

PEREIRA, H.G.; AZEREDO, R.S.; LEITE, J.P.G.; CANDEIAS, J.A.N.; RÁCZ, M.L.; LINHARES, A.C.; GABBAY, Y.B.; TRABULSI, J.R. Eletrophoretic study of the genome of human rotaviruses from Rio de Janeiro, São Paulo and Belém, Brazil. **Journal of Hygiene**, v.90, p.117-125, 1983a.

PEREIRA, H.G.; AZEREDO, R.S.; LEITE, J.P.G.; BARTH, O.M.; SUTMOLLER, F.; FARIAS DE VIDAL, M.N.P. Comparison of polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), immunoelectron microscopy (IME) and enzyme immunoassay (EIA) for the rapid diagnosis of rotavirus infection in children. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, n.78, p.484-490, 1983b.

RAMIG, R.F. Pathogenesis of intestinal and systemic rotavirus infection. **Journal of Virology**, v.78, n.19, p.10213-10220, 2004.

REBEL, J.M.J.; BALK, F.R.M.; POST, J.; VAN HEMERT, S; ZEKARIAS, B.; STOCKHOFE, N. Malabsorption syndrome in broilers. **World's Poultry Science Journal**, v.62, p.17-29, 2006.

RIOS, R.L.; MARIN, S;Y.; GOMES, A.M.; RESENDE, J.S.; BONFIM, M.R.Q.; GOMES, A.D.; RESENDE, F.M.S.; HORTA, R.S.; RESENDE, M.; MARTINS, N.R.S. The occurrence of Orthoreovirus, Rotavirus and chicken anemia virus in chickens of the poultry industry in Minas Gerais, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.64, n.6, p.1613-1620, 2012.

RIOS, R.L. **Deteção molecular de reovírus e rotavírus na avicultura industrial de Minas Gerais**. 2010. 37f. Dissertação (mestrado) – Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2010.

RUIZ, M.C.; LEON, T.; DIAZ, Y.; MICHELANGELI, F. Molecular Biology of Rotavirus Entry and Replication. **The Scientific World Journal**, v.9, p.1476-1497, 2009.

SAIF, Y.M.; FADLY, A.M.; GLISSON, J.R.; MCDUGALD, L.R.; NOLAN, L.K.; SWAYNE, D.E. **Diseases of Poultry**. 12 ed. USA: Blackwell Publishing. 2008.

SCHUMANN, T.; HOTZEL, H.; OTTO, P.; JOHNE, R. Evidence of interspecies transmission and reassortment among avian group A rotaviruses. **Virology**, v.386, p.334-343, 2009.

SILVA, R.R.; BEZERRA, B.A.M.; KAIANO, J.H.L; MANNO, M.C.; OLIVEIRA, D.S.; SAGICA, F.E.S.; GABBAY, Y.B.; CHAVES, S.O.C.; SILVA, A.L.C.; ALFIERI, A.A.; MASCARENHAS, J.D.P. Molecular epidemiology of avian rotavirus in fecal samples of broiler chickens in Amazon region, Brazil, from August 2008 to May 2011. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v.4, n.2, p.55-62, 2013.

SINDIAVIPAR – Sindicato das indústrias de produtos avícolas do estado do Paraná. **Anuário Paranaense da avicultura**, 2015. Disponível em: <<http://www.sindiavipar.com.br/pdfs/folder-2015.pdf>> Acesso em: 22 setembro 2015.

SPACKMAN, E.; DAY, J.M.; PANTIN-JACKWOOD, M.J. Astrovirus, reovirus, and rotavirus concomitant infection causes decreased weight gain in broad-breasted white poult. **Avian Disease**, v.54, p.16-21, 2010.

TAMEHIRO, C.Y.; ALFIERI, A.F.; ALFIERI, A.A. Infecções entéricas de origem viral. In: REVOLLEDO, L.; PIANTINO, A.J.F.(Org.) **Patologia Aviária**.1 ed. Barueri-SP: Manole, 2007. p.245-257.

TAMEHIRO, C.Y.; ALFIERI, A.F.; MÉDICI, K.C.; ALFIERI, A.A. Segmented double stranded genomic RNA viruses in fecal samples from broiler chicken. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.34, n.4, p.344-348, 2003.

THEIL, K.W.; SAIF, Y.M. Age-related infections with rotavírus, rotavirus like vírus, and atypical rotavírus in turkey flocks. **Journal of Clinical Microbiology**. v.25, n.2, p.333-337, 1987.

TODD, D.; MCNULTY, M.S.; ALLAN, G.M. polyacrylamide gel eletrophoresis of avian rotavirus RNA. **Archives of Virology**, v.63, p.87-97, 1980.

TODD, D.; MCNULTY, M.S. Eletrophoretic variation of avian rotavirus RNA in polyacrylamide gels. **Avian Pathology**, v.15, n.1, p.149-159, 1986.

TROJNAR, E.; OTTO, P.; JOHNE, R. The first complete genome sequence of a chicken group A rotavirus indicates independent evolution of mammalian and avian strains. **Virology**, v.386, p.325-333, 2009.

UBABEF – União Brasileira de Avicultura. A indústria avícola. Disponível em: <<http://www.brazilianchicken.com.br/home/sistemadeintegracao>> Acesso em: 28 setembro de 2015.

URSU, K.; KISFALI, P.; RIGO, D.; IVANICS, E.; ERDELYI, K.; DAN, A.; MELEGH, B.; MARTELLA, V.; BANYAI, K. Molecular analysis of the VP7 gene of characterization of avian enteric viruses pheasant rotaviruses identifies a new genotype, designated G23. **Archives of Virology**, v.154, p.1365-1369, 2009.

USDA – United States Department of Agriculture. **Poultry Slaughter annual report**, 2015b. Disponível em: <<http://usda.mannlib.cornell.edu/usda/current/PoulSlau/PoulSlau-08-25-2015.pdf>> Acesso em: 22 setembro de 2015.

USDA – United States Department of Agriculture. **Livestock and Poultry: World Markets and Trade**. 2015a. Disponível em: <apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/livestock_poultry.PDF> Acesso em: 18 de janeiro de 2016.

VILLARREAL, L.Y.B. **Detecção de um coronavírus entérico aviário em aves de corte, poedeiras comerciais e matrizes: distribuição, diversidade molecular e diagnóstico diferencial com outros vírus entéricos aviários**. 2006. 96f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Patologia, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2006.

VILLARREAL, L.Y.B.; ULIANA, G.; VALENZUELA, C.; CHACÓN, J.L.V.; SAIDENBERG, A.B.S.; SANCHES, A.A.; BRANDÃO, P.E.; JEREZ, J.A.; FERREIRA, A.J.P. Rotavirus detection and isolation from chickens with or without symptoms. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v.8, n.3, p.187-191, 2006.

Viral Zone. Rotavírus. 2011. Disponível em: <http://viralzone.expasy.org/all_by_species/107.html> Acesso em: 21/01/2016.

YASON, C.V.; SCHAT, K.A. Pathogenesis of rotavirus infection in various age groups of chickens and turkeys: clinical signs and virology. **American Journal of Veterinary Research**, v.48, n.6, p.977-983, 1987.

ZAVALA, G. Runting stunting syndrome (RSS) in broilers: in vivo studies. 2006 Disponível em: <www.poultry-health.com/fora/inthelth/zavala_wpdc_06.pdf> Acesso em: 26/01/2016.

ZSACK, L.; CHA, R.M.; DAY, J.M. Chicken parvovirus–induced runting-stunting syndrome in young broilers. **Avian Diseases**, v.57, p.123-127, 2013.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

- Investigar a ocorrência de AvRV em plantéis avícolas comerciais no município de Palotina, Paraná.

4.2 Objetivos específicos

- Detectar e identificar os eletroferogrupos de AvRV em conteúdo entérico de frangos de corte refugio, com sinais de SMA, e em aves clinicamente saudáveis provenientes de granjas industriais do município de Palotina, Paraná;
- Correlacionar a frequência de ocorrência de AvRV com o índice de eficiência produtivo (IEP) dos lotes aviários;
- Detectar e identificar os eletroferogrupos de AvRV em amostras de cama de aviário;
- Avaliar as alterações histológicas e morfométricas do intestino delgado de aves refugos infectadas pelo AvRV e de aves clinicamente sadias (controle);
- Correlacionar a presença das espécies de AvRV com o grau de severidade das alterações histológicas em diferentes porções do intestino delgado;
- Avaliar possíveis correlações da presença de AvRV e a SMA.

5 CAPÍTULO 1 – ROTAVÍRUS AVIÁRIO: OCORRÊNCIA, CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL ELETROFORÉTICO E AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E MORFOMÉTRICA EM FRANGOS DE CORTE NATURALMENTE INFECTADOS.

Resumo

Na produção avícola as infecções entéricas afetam diretamente o desempenho das aves. A detecção de rotavírus aviário (AvRV) tem sido associada à enterite em frangos de corte e a Síndrome da Má Absorção (SMA). Este estudo teve como objetivos investigar a frequência da ocorrência de AvRV; caracterizar os eletroferogramas de AvRV e avaliar histologicamente o intestino delgado de frangos de corte naturalmente infectados. Foram coletadas amostras individuais de conteúdo entérico e três porções do intestino delgado (P1/P2/P3) de frangos de corte refugo com sinais da SMA (n=256), de frangos de corte clinicamente saudáveis (controle) (n=24), e amostras de cama (n=36) de 12 lotes aviários do município de Palotina com diferentes índices de eficiência produtiva (IEP). Para detecção do AvRV no conteúdo entérico foi utilizada a eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA). As porções do intestino dos frangos positivos na EGPA para AvRV e das frangos controle foram avaliadas histologicamente. AvRV foi detectado em 10/12 (83%) dos lotes avaliados, e em 60/256 (23,44%) das amostras de frangos refugo, tendo sido identificados os perfis eletroforéticos de rotavírus aviário espécie A (AvRV-A), rotavírus aviário espécie D (AvRV-D) e rotavírus aviário espécie F (AvRV-F) em 9 (15%), 18 (30%) e 33 (55%) amostras, respectivamente. Nas amostras de frangos clinicamente saudáveis foi identificado o perfil AvRV-A e AvRV-D em duas amostras distintas. Em 29 (11,3%) das amostras o perfil foi inconclusivo. Nas amostras de cama foi possível detectar AvRV-A e AvRV-F em lotes distintos de IEP ruim, e AvRV-F em um lote de IEP regular. A taxa de detecção de AvRV foi estatisticamente maior em lotes de IEP ruim quando comparado ao IEP bom. As lesões avaliadas foram compatíveis com a SMA, e mais acentuadas nos casos associados à infecção pelo AvRV-A. Na histomorfometria, a redução do comprimento de vilo e relação vilo/cripta nas porções mais craniais do intestino delgado foram estatisticamente significativas dos frangos de corte infectados por AvRV quando comparadas às amostras controle. Este estudo relata a ocorrência das espécies A, D e F em frangos de corte de plantéis comerciais e demonstra indícios da associação do AvRV com a SMA.

Palavras-chave: rotavírus, frango de corte, índice de eficiência produtiva, avaliação histopatológica, histomorfometria, síndrome da má absorção

5.1 Introdução

As enterites ocasionam perdas econômicas significativas na avicultura industrial, em decorrência da diarreia, desidratação e redução da conversão alimentar que resultam no baixo desenvolvimento corporal dos animais afetados. A causa da enterite é complexa, multifatorial e multietiológica (GUY, 1998; SAIF et al., 2008). Entre os agentes virais, tem sido atribuído aos rotavírus (RV) a etiologia primária da enterite em frangos de corte bem como da Síndrome da Má Absorção (SMA) (HAYNES et al., 1994; MCNULTY et al., 1983;1984a; OTTO et al., 2006; YASON e SCHAT, 1986). A SMA ou *Runting Stunting Syndrome (RSS)* é a denominação utilizada para caracterizar o quadro clínico de enterite, anorexia e severa perda de peso principalmente nas duas primeiras semanas de idade das aves. Entre as consequências da SMA, incluem a refugagem dos animais e desuniformidade dos lotes, que culminam com baixos índices de eficiência produtiva e significativos prejuízos econômicos (DECAESSTECKER et al., 1986; MCNULTY e REYNOLDS, 2008; REBEL et al., 2006).

O RV pertence à família *Reoviridae* e é classificado em oito espécies distintas (A a H) das quais A, D, F e G podem acometer as aves (ICTV, 2014). O genoma viral do RV é constituído por 11 segmentos de RNA fita dupla (*dsRNA*) de tamanhos moleculares distintos. O agrupamento dos segmentos genômicos em gel de poliacrilamida permite a caracterização das diferentes espécies de RV de acordo com os padrões de migração. Em aves são observados os seguintes padrões de migração de acordo com as espécies de RV: A (5:1:3:2), D (5:2:2:2), F (4:1:2:2:2) e G (4:2:2:3) (ESTES e KAPIKIAN, 2007; TODD e MCNULTY, 1986).

Devido à alta excreção viral no período agudo da doença (10^{10} a 10^{12} partículas virais/grama de excretas) e a característica segmentada do genoma, a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) é uma ferramenta diagnóstica de fácil aplicação, que ainda permite caracterizar o RV em eletroferotipos e eletrferogrupos (ALFIERI et al., 2000; GUY, 1998; TODD e MCNULTY, 1986).

O presente estudo reporta a ocorrência e caracterização do perfil eletroforético de AvRV detectados em amostras de conteúdo entérico de frangos refugos com sinais de SMA, provenientes de aviários comerciais em uma região altamente produtora. Ainda, descreve as alterações histológicas no intestino delgado de frangos naturalmente infectados e frangos clinicamente saudáveis, e avalia possíveis associações entre a presença do AvRV e a SMA.

5.2 Material e métodos

5.2.1 Local do estudo – O estudo foi conduzido no município de Palotina, localizado na mesorregião oeste do estado do Paraná, que abriga a sede e o complexo avícola da quinta maior empresa exportadora de carne de frango do Brasil (ABPA, 2015; BELUSSO e HESPANHOL, 2010).

5.2.2 Lotes aviários e aves – Foram avaliados doze lotes (A a L) de aviários comerciais de frango de corte com densidade entre 12 aves/m² - 15.6 aves/m². Os lotes foram selecionados de acordo com os índices de eficiência produtiva (IEP) categorizados pela empresa integradora como bom (n=4); regular (n=4), ou ruim (n=4). O IEP é o principal indicador para mensurar o desempenho zootécnico de um lote de frangos de corte, e utiliza os parâmetros de ganho de peso diário (kg), viabilidade (%) e conversão alimentar para determinar a eficiência produtiva (AVILA et al., 1992).

Foram avaliados frangos de corte da linhagem COBB 500 com idades entre 7 a 14 dias que recebiam dieta comercial e água *ad libitum*. De cada lote foram selecionadas 20 a 22 aves refugos (n=256) e dois frangos clinicamente saudáveis (controle) (n=24), totalizando 280 aves. Os frangos refugos apresentavam sinais clínicos indicativos da SMA, como tamanho reduzido, prostração, cloaca com excretas aderidas e penas eriçadas. As aves amostradas foram eutanasiadas por deslocamento cervical manual (resolução nº 1000/2012 do CFMV) para coleta de conteúdo entérico e porções de intestino delgado, representativas de cada indivíduo (Tabela 1). As coletas foram realizadas nos meses de fevereiro, março e outubro de 2015.

Tabela 1 - Caracterização dos lotes e amostras coletadas de aviários de frangos de corte do município de Palotina, PR.

LOTES AVIÁRIOS				AMOSTRAS COLETADAS (n)		
IEP ^a	Código do lote	Data da coleta	Idade das aves (dias)	Cama de aviário	Conteúdo entérico; porções do ID ^b (P1; P2; P3)	
					Aves refugo	Aves controle
Bom	A	13/02/2015	14	3	20	2
	B	27/02/2015	8	3	22	2
	C	27/02/2015	8	3	22	2
	D	15/10/2015	13	3	22	2
Regular	E	26/02/2015	9	3	20	2
	F	02/03/2015	9	3	22	2
	G	13/02/2015	14	3	22	2
	H	15/10/2015	14	3	22	2
Ruim	I	13/02/2015	8	3	20	2
	J	13/02/2015	9	3	22	2
	K	05/03/2015	7	3	22	2
	L	15/10/2015	14	3	22	2
TOTAL				36	256	24

^a Índice de Eficiência Produtiva; ^b Intestino delgado: P1= duodeno medial; P2= jejuno-medial; P3= jejuno adjacente ao vestígio do saco vitelínico

5.2.3 Coleta de amostras:

- **Cama de aviário** – De cada lote aviário foram selecionados três pontos aleatórios para coleta da cama de aviário. As amostras foram armazenadas em frascos individuais, e acondicionadas em caixa térmica com gelo reciclável para transporte. Posteriormente as amostras foram armazenadas a -20°C até o processamento laboratorial.
- **Amostras histológicas** – Imediatamente após a eutanásia os intestinos de cada ave foram removidos. Foram coletadas três secções transversais de 3 a 5 cm de comprimento do intestino delgado de cada ave. A primeira porção (P1) correspondeu ao duodeno medial, a segunda (P2) ao jejuno-medial, e a terceira (P3) ao jejuno adjacente ao vestígio do saco vitelínico (Divertículo de Meckel). As amostras histológicas foram imediatamente fixadas em formalina tamponada 10%.
- **Conteúdo entérico** – À necropsia procedeu-se a compressão digital do intestino grosso para extravasamento do conteúdo entérico em microtubos. As amostras foram imediatamente acondicionadas em caixa térmica com gelo

reciclável para transporte, e posteriormente mantidas a -20°C até o processamento laboratorial.

5.2.4 Processamento laboratorial:

- **Suspensões fecais** – As amostras de conteúdo entérico e cama de aviário foram diluídas em solução tampão de estabilização de rotavírus (TERV), pH 7,4 (Tris-HCl 50 mM; NaCl 10 mM; 2-mercaptoetanol 1,5 mM; CaCl₂ 3 mM) com concentração final de 10 a 20% (peso/volume), homogeneizadas por agitação mecânica vigorosa, centrifugadas a 5000 rpm por 5 minutos, tendo o sobrenadante recolhido e estocado a -4°C para posterior análise.
- **Extração de ácido nucleico viral** – Alíquotas de 450 µL das suspensões fecais foram tratadas com sódio dodecil sulfato (SDS) com concentração final de 1% (volume/volume) homogeneizadas e mantidas em banho-maria a 56°C por 30 minutos. Após, a extração do dsRNA foi realizada utilizando uma combinação das técnicas fenol/ clorofórmio/ álcool isoamílico (25:24:1) e sílica/ tiocianato de guanidina com pequenas modificações (ALFIERI et al., 2006). Para a validação dos procedimentos de extração, foram inclusas alíquotas de água DPEC como controle negativo e amostras fecais de bovinos rotavírus A positivas como controle positivo.
- **Eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA)** – Os ácidos nucleicos extraídos foram submetidos a EGPA 7,5% e corados com nitrato de prata para avaliação dos perfis eletroforéticos do dsRNA segmentado de AvRV (HERRING et al., 1982; PEREIRA et al., 1983).
- **Processamento histológico** – Nas amostras de aves controle e positivas para AvRV os tecidos intestinais fixados em formol foram processados rotineiramente para coloração de hematoxilina-eosina segundo Luna, (1968). As lâminas foram analisadas em microscópio de luz acoplado ao sistema de captura de imagens *Leica Application Suit L.A.S. versão 3.8[®]*.
- **Morfometria intestinal** – Com auxílio do programa *Image-Pro Plus[®] versão 4.5.0.29* foram aferidas altura e largura das vilosidades, e profundidade da região de cripta para determinação da relação vilo/cripta . Por secção foram mensurados 10 vilos e 10 criptas.
- **Avaliação das lesões microscópicas** – Os segmentos do intestino foram avaliados qualitativamente quanto à presença de lesões como

espessamento, atrofia e fusão de vilosidades; presença de granulócitos/heterófilos; apoptose de enterócitos; abscesso de criptas e infiltrado inflamatório de lâmina própria. As lesões foram classificadas conforme a gravidade em: ausente (-); leve (+); moderada (++) e acentuada (+++).

5.2.5 Análise estatística – Os dados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade (PROC UNIVARIATE), e as variáveis que não apresentaram distribuição normal foram transformadas (PROC RANK) buscando-se normalizar os dados para execução da análise de variância.

Os dados de frequência de AvRV e dos diferentes eletroferogrupos detectados nas aves foram submetidos a análise de variância (PROC GLM) em relação ao IEP dos lotes e aos grupos etários (7 a 9 dias; 13 e 14 dias). Quando o efeito de manejo foi significativo, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey (PROC MEANS); para o efeito significativo de grupos etários, procedeu-se a comparação das médias pelo teste de Fischer (PROC GLM).

Os dados de histomorfometria do intestino delgado das aves que apresentaram infecção por rotavírus foram submetidos a análise de variância (PROC GLM) em relação aos diferentes eletroferogrupos de AvRV identificados nos indivíduos avaliados. A idade das aves foi utilizada como covariável nas análises de variância em que foram avaliados os efeitos dos eletroferogrupos de AvRV identificados nos indivíduos avaliados dentro de cada grupo etário, buscando-se melhorar a acurácia dos modelos estatísticos adotados. Para o efeito significativo de grupos etários, procedeu-se a comparação das médias pelo teste de Fischer (PROC GLM); e para o efeito significativo de AvRV, as médias dos grupos infectados foram comparadas com a média do grupo controle pelo teste de Dunnett (PROC LSMEANS).

Adotou-se o nível de significância de 10% para todas as análises, que foram realizadas no programa *Statistical Analysis System* (SAS), versão 9.0.

5.2.6 Bioética – O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina, sob o Protocolo nº 15/2014.

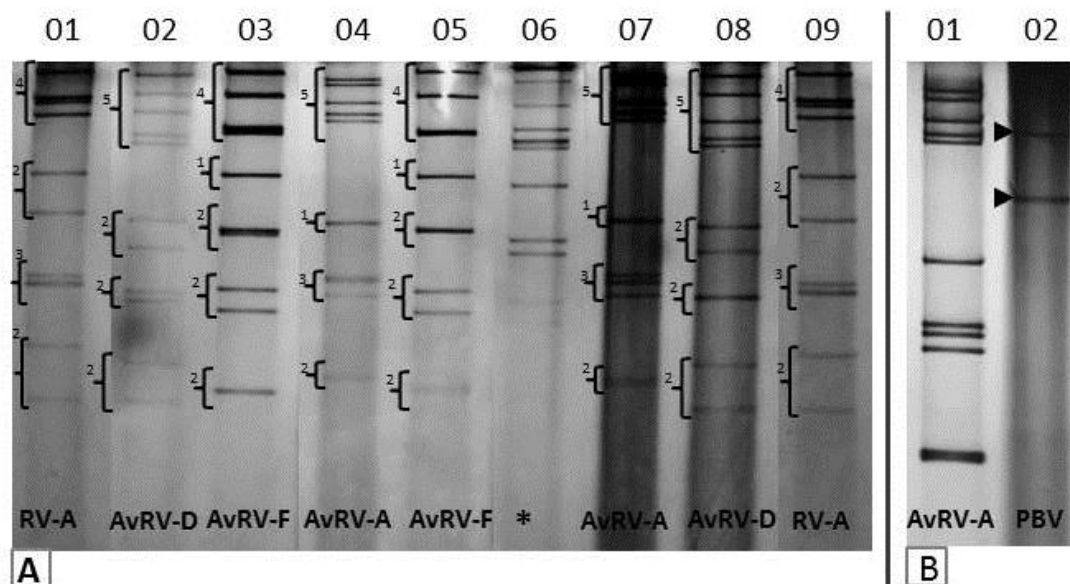
5.3 Resultados

5.3.1 Detecção de AvRV por EGPA

O AvRV foi detectado em 10 (83%) dos 12 lotes aviários avaliados. Das 256 amostras de conteúdo entérico, representativas de cada frango refugo, foi possível a detecção e caracterização eletroforética das espécies de AvRV em 60 (23,44%) amostras. As espécies AvRV-A (5:1:3:2), D (5:2:2:2) e F (4:1:2:2:2) foram identificadas em 9 (15%); 18 (30%) e 33 (55%) amostras, respectivamente. O perfil eletroferogrupo AvRV-D foi confirmado por RT-PCR com amplificação parcial do gene VP6 e sequenciamento genômico (dados não mostrados) (BEZERRA et al., 2012).

Além disso, 12 amostras de conteúdo entérico revelaram-se positivas para *Picobirnavirus* (PBV), entre as quais cinco apresentaram co-infecção com AvRV-F. As amostras positivas para PBV foram confirmadas por RT-PCR com a amplificação parcial do gene RdRp (dados não mostrados) (ROSEN et al., 2000). A distribuição dos resultados em números absolutos de acordo com os lotes avaliados está representada na Tabela 2. Em 29/256 (11,3%) amostras não foi possível definir o eletroferogrupo de AvRV devido à baixa resolução dos fragmentos genômicos, perfil de migração eletroforética atípico ou presença de múltiplas bandas sugestivas de infecção mista. A Figura 1 ilustra os padrões eletroforéticos detectados neste estudo.

Figura 1 - Eletroforese em gel de poliacrilamida seguida pela coloração por nitrato de prata de ácidos nucleicos extraídos de conteúdo entérico de frangos de corte refugos dos aviários comerciais de Palotina, PR (fevereiro a outubro de 2015). As chaves representam o número de segmentos genômicos de acordo com o perfil de migração eletroforética das espécies de AvRV. Painel A: Canaletas 1 e 9: Controle positivo RVA bovino (padrão 4:2:3:2); Canaletas 4 e 7: eletroferogrupo de AvRV-A (padrão 5:1:3:2); Canaletas 2 e 8: eletroferogrupo AvRV-D (padrão 5:2:2:2); Canaletas 3 e 5: eletroferogrupo AvRV-F (padrão 4:1:2:2:2); Canaleta 6 (*): eletroferogrupo inconclusivo. Painel B: Canaleta 1: eletroferogrupo AvRV-A; Canaleta 2: Picobirnavírus (PBV).



Das 24 amostras representativas dos frangos de corte controle, o AvRV foi detectado em apenas duas, sendo uma amostra positiva para AvRV-A e um de AvRV-D. Entre as 36 amostras de cama avaliadas, o AvRV foi detectado em uma amostra de lote com IEP regular (AvRV-F) e em duas camas de lotes distintos com IEP ruim (AvRV-A e AvRV-F).

Tabela 2 - Distribuição das espécies de AvRV e PBV detectadas em amostras de conteúdo entérico de aves refugos de acordo com o índice de eficiência produtiva (IEP) dos lotes de aviários do município de Palotina, PR.

Aviários				Resultado da EGPA ^a				
IEP	Lote	Idade das aves (dias)	nº aves coletadas	AvRV-A	AvRV-D	AvRV-F	PBV	AvRV F + PBV
Bom	A	14	21	nd	2	6	1	1
	B	8	22	nd	nd	nd	nd	nd
	C	8	22	nd	nd	2	nd	nd
	D	13	22	1	nd	nd	nd	nd
	Subtotal		87	1	2	8	1	1
Regular	E	9	20	nd	nd	nd	nd	nd
	F	9	22	nd	nd	3	1	nd
	G	14	20	nd	nd	10	nd	4
	H	14	22	3	nd	nd	3	nd
	Subtotal		84	3	nd	13	4	4
Ruim	I	8	21	nd	nd	3	nd	nd
	J	9	22	nd	nd	4	nd	nd
	K	7	20	nd	16	nd	nd	nd
	L	14	22	5	nd	nd	2	nd
	Subtotal		85	5	16	7	2	nd
TOTAL			256	9	18	28	7	5

^and = não detectado

Na análise de correlação do AvRV com os índices zootécnicos, foi observada diferença estatística com maior frequência de detecção em frangos refugio de lotes com IEP ruim em comparação aos lotes com IEP bom (Teste de Tukey, $p= 0,007$). Embora os lotes de IEP regular não diferiram estatisticamente do IEP bom e ruim, o mesmo se manteve em uma categoria intermediária na frequência de detecção do AvRV (Tabela 3). Quanto à distribuição dos resultados por espécies de AvRV e faixa etária dos frangos acometidos, a ocorrência de AvRV-A ocorreu somente em frangos com 13 a 14 dias (Teste de Fischer, $p<0,0001$). Em contrapartida, as espécies D e F foram significativamente mais frequentes nos frangos com 7 a 9 dias de idade (Teste de Fisher, $p\leq 0,05$).

Tabela 3 - Distribuição da frequência de diagnóstico de AvRV pela técnica de EGPA em frangos de corte refugos de acordo com a classificação do índice de eficiência produtiva (IEP) dos lotes de aviários do município de Palotina, PR.

IEP lotes	Diagnóstico de AvRV por EGPA		TOTAL
	Positivo (%)	Negativo (%)	
Bom	12 (13,79) ^B	75 (86,2)	87
Regular	20 (23,8) ^{AB}	64 (76,2)	84
Ruim	28 (33) ^A	57 (67)	85
TOTAL	60 (23,44)	196 (76,56)	256

Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes, na mesma coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,10)

5.3.2 Avaliação histopatológica

Para a avaliação histopatológica qualitativa e de morfometria intestinal, foi possível obter cortes histológicos com qualidade satisfatória de 16 amostras de frangos controles e de 41 amostras de frangos refugo positivos para AvRV. Nas aves controles, as alterações histopatológicas, quando presentes, eram de grau leve, com predomínio de espessamento de vilo nas três porções do intestino delgado e infiltrado inflamatório de lâmina própria na P1. O comprimento das vilosidades diminuiu ao longo do intestino delgado, com maior tamanho na porção cranial, como é esperado histologicamente (OTTO et al., 2006). A relação vilo/cripta variou entre 9,02 $\mu\text{m} \pm 2,54$ na P1, na P2 6,40 $\mu\text{m} \pm 1,98$ e P3 5,27 $\mu\text{m} \pm 1,97$.

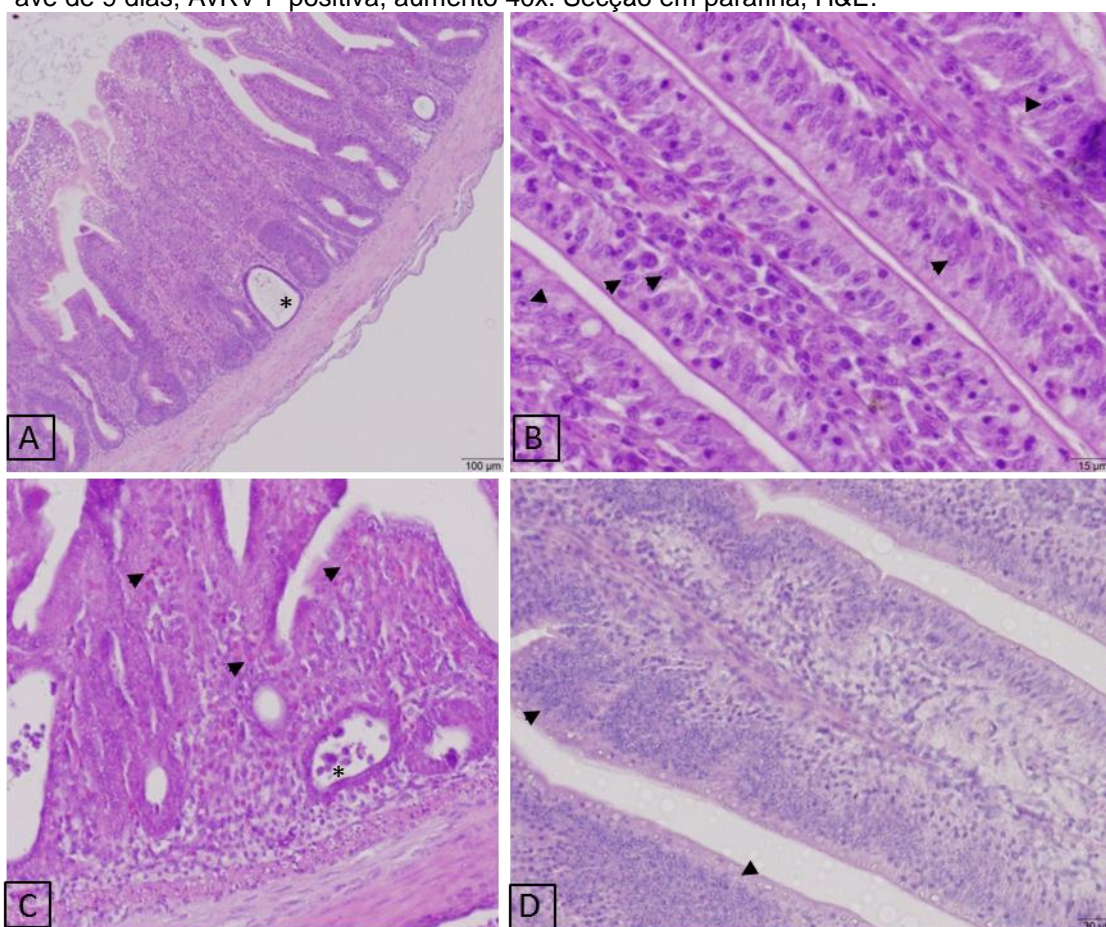
Nas amostras provenientes de aves refugos, as lesões mais acentuadas de espessamento, atrofia e fusão das vilosidades, abcesso de cripta, presença de granulócitos e infiltrado inflamatório de lâmina própria foram visualizadas nas amostras positivas para AvRV-A em todas as porções avaliadas, porém mais acentuadas nas porções P1 e P2 (Fig. 2A). Nos casos identificados com acentuada atrofia a relação vilo/cripta foi de 4,17 a 5,17 μm na P1.

Foi identificado em amostras positivas para AvRV-D. Abcesso de cripta (leve a moderado) com grau leve de apoptose de enterócitos nas porções P1 e P2 (Fig. 2B). Na estratificação por idade, as aves de 7 a 9 dias apresentaram atrofia de vilo (leve a acentuada) na porção P3 (Fig. 2C).

Na avaliação histológica do intestino delgado de frangos infectados pelo AvRV-F foram observadas lesões, como presença de granulócitos e infiltrado

inflamatório de lâmina própria (Fig. 2D), que variaram de grau leve a moderado em todas as porções (P1, P2 e P3) avaliadas. As lesões de espessamento, atrofia e fusão de vilos foram mais evidentes nas porções P2 e P3 de frangos refugos entre 7 a 9 dias.

Figura 2 - Alterações histológicas detectadas no intestino delgado de frangos de corte refugo infectados pelo rotavírus aviário (AvRV). (A) Lesões acentuadas de espessamento, atrofia e fusão de vilos, e abscesso de cripta (*), na porção P1 (duodeno medial) de frango de 14 dias; AvRV-A positiva; relação vilo/cripta de 5,7 μm ; aumento 6x. (B) Presença leve de células apoptóticas (seta) na porção P1 (duodeno medial) de frango de 14 dias; AvRV-D positiva; aumento 40x. (C) Lesões acentuadas de atrofia e fusão de vilos com presença de granulócitos (seta), e abscesso de cripta (*) na porção P3 (jejuno adjacente ao vestígio do saco vitelínico) em frango de 7 dias; AvRV-D positiva; relação vilo/cripta de 1,7 μm ; aumento 20x. (D) Infiltrado inflamatório acentuado na lâmina própria (seta) na porção P2 (jejuno medial) de ave de 9 dias; AvRV-F positiva, aumento 40x. Secção em parafina, H&E.



5.3.3 Avaliação morfométrica e estatística

Na avaliação morfométrica as médias de comprimento de vilo (μm), profundidade de cripta (μm) e relação vilo/cripta (μm) foram compiladas em dois grupos etários, grupo de 7 a 9 dias e grupo de 13 a 14 dias (Tabela 4). Na faixa etária de 7 a 9 dias as amostras provenientes de aves positivas para

AvRV-D diferiram do grupo controle na relação vilo/cripta das porções P1 e P2 (Teste de Dunnet, $p=0,02$), enquanto que as positivas para AvRV-F apresentaram diferença somente na porção P1 (Teste de Dunnet, $p=0,02$). No grupo etário de 13 a 14 dias, as três espécies de RV detectadas apresentaram diferença estatística quando avaliado o comprimento de vilo em relação ao controle (Teste de Dunnet, $p = 0,01$), porém somente o grupo infectado com AvRV-A apresentou diferença estatística na razão vilo/cripta da porção P1 ($p=0,002$) quando comparada ao controle. Em nenhuma faixa etária foi observada diferença estatística na porção P3 e na profundidade de cripta das porções avaliadas (Tabela 4).

Tabela 4 - Médias de comprimento de vilo (μm), profundidade de cripta (μm) e relação vilo/cripta (μm) dos três segmentos do intestino delgado (P1, P2, P3) de frangos de corte refugos e controle, estratificados em duas faixas etárias (7-9 e 13-14 dias).

Idade (dias)	Condição	Comprimento de vilo (μm)			Profundidade de cripta (μm)			Relação Vilo/cripta (vi/cr)		
		P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3
7-9	Controle	1038,35	839,04	656,09	132,35	142,95	136,33	8,22	6,30	5,08
	AvRV-A	nd	nd	nd	nd	nd	Nd	nd	nd	nd
	AvRV-D	884,49	608,53	487,99	171,33	154,22	129,47	5,55*	4,13*	3,83
	AvRV-F	1041,43	757,94	631,40	183,51	163,54	131,54	5,99*	4,85	5,03
13-14	Controle	1714,99	929,44	701,58	177,45	156,59	134,26	10,05	6,52	5,52
	AvRV-A	1299,91*	850,66	810,39	202,79	169,34	165,64	6,17*	5,20	5,01
	AvRV-D	1332,97*	1008,83	825,57	185,96	157,19	149,84	7,15	6,74	6,01
	AvRV-F	1464,32*	1013,92	804,81	178,36	136,62	116,89	8,26	6,36	6,78

* Médias que diferem apenas do grupo controle de acordo com o teste de Dunnett ($P < 0,10$)

Porções intestino delgado: P1= duodeno medial; P2= jejuno-medial; P3= jejuno adjacente ao vestígio do saco vitelínico;
nd = não detectada

5.4 Discussão

A ocorrência de AvRV em frangos de corte já foi descrita com frequências variáveis em diversos países (MCNULTY e REYNOLDS, 2008). Em nosso estudo, de 256 amostras de conteúdo entérico de frangos de corte refugo avaliadas, 60 (23,44%) foram positivas para AvRV pela técnica de EGPA. Em estudos que também utilizaram a EGPA como ferramenta diagnóstica, a frequência de ocorrência do AvRV variou de 0,86 a 64% em diferentes localidades na Índia e Alemanha (AHMED e AHMED, 2006; ALAM et al., 2011; ISLAM et al., 2009; KARIM et al., 2007b; MALIK et al., 2013; OTTO et al., 2006; SAVITA et al., 2008). No Brasil as frequências variaram entre 8,47 a 18% nos estados de Minas Gerais e Paraná (ALFIERI et al., 1989; RIOS et al., 2012; TAMEHIRO et al., 2003).

Entre as vantagens da EGPA está a possibilidade de caracterizar a espécie de AvRV pelo perfil de mobilidade eletroforética dos segmentos genômicos no gel de poliacrilamida (MCNULTY et al., 1984b). Das 60 amostras positivas avaliadas neste estudo, o AvRV-F foi o eletroferogrupo mais frequente (55%), seguido pelo AvRV-D (30%) e AvRV-A (15%). Ainda, foram classificados como inconclusivos os perfis eletroforéticos de 11,3% das amostras de frangos refugo, numa frequência inferior à relatada (19,2%) em um estudo anterior no Brasil (TAMEHIRO et al., 2003). Embora a EGPA permita a visualização de eletroferogrupos e eletroferotipos distintos (MCNULTY et al., 1984b), a classificação de uma espécie baseada na análise de migração do dsRNA é complexa pela possibilidade de rearranjos genômicos, coinfeções com outros vírus segmentados como PBV e reovírus, ou ainda infecções mistas de RV (JOHNE et al., 2011; SAVITA et al., 2008; SCHUMANN et al., 2009; TODD e MCNULTY, 1986).

Diferentemente dos resultados apresentados neste estudo, o AvRV-D foi a espécie de RV mais detectada em frangos de corte em outros trabalhos que utilizaram a EGPA para identificação da espécie, com taxas de detecção entre 1,43% a 35% (ISLAM et al., 2009; KARIM et al., 2007a,b; MALIKI, et al., 2013; OTTO et al., 2006; SAVITA et al., 2008).

Com a utilização de técnicas mais sensíveis como a RT-PCR, foram relatadas taxas de detecção de até 66% para AvRV-D e 82% para AvRV-A nos Estados Unidos, Índia, e diferentes países da Europa (KATOOR et al., 2013; OTTO et al.,

2006; OTTO et al., 2012; PANTIN JACKWOOD et al., 2007). No Brasil foram relatadas frequências de AvRV-D em frangos de corte variando entre 35,3% a 53,3% e o AvRV-A entre 37,5% a 41,1%, seguida pela ocorrência de AvRV-G com 10,6% (BESERRA et al., 2014a; MASCARENHAS et al., 2016; SILVA et al., 2013).

Em contraste à sugestão de que a espécie AvRV-F ocorra com menor frequência em frangos (BESERRA et al., 2014b; OTTO et al., 2006; 2012) e excretada em menores títulos (MASCARENHAS et al., 2016), o presente trabalho obteve frequência de AvRV-F em 12,9% (33/256) das amostras de frangos de corte refugio avaliadas por EGPA, sendo a espécie mais detectada. No Brasil, até o presente momento, o AvRV-F só foi detectado por RT-PCR com taxas entre 9,4% e 18,5% utilizando RT-PCR (BESERRA et al., 2014b; MASCARENHAS et al., 2016) portanto, este é o primeiro relato de identificação do AvRV-F por caracterização eletroferotípica em EGPA, no Brasil.

Embora em duas amostras controle tenha sido detectado AvRV, a frequência encontrada em aves clinicamente saudáveis foi muito inferior que em aves doentes/refugos, como já relatado anteriormente (BEZERRA et al., 2012; 2014; MCNULTY e REYNOLDS, 2008; OTTO et al., 2006; 2012; TAMEHIRO et al., 2003; VILLARREAL et al., 2006).

As variações nas frequências de detecção observadas podem ser influenciadas por fatores inerentes ao próprio hospedeiro (idade, linhagem, condição imunológica), representatividade amostral (número de amostras e método de coleta) bem como pelo método analítico utilizado para o diagnóstico. (KARIM et al., 2007a; OTTO et al., 2012; SILVA et al., 2013). A representatividade amostral, por coleta de conteúdo entérico individual, pode ser uma das explicações para a maior frequência de AvRV-F relatada neste estudo. Beserra et al. (2014b) e Mascarenhas et al. (2016) avaliaram *pool* de amostras de excretas de diferentes indivíduos. Neste método de amostragem, uma amostra positiva pode tornar-se indetectável na EGPA pela redução da concentração viral frente à mistura com amostras negativas.

Uma vez que neste estudo não foram utilizados métodos de amplificação genômica, é muito provável que as taxas de detecção de AvRV seriam superiores. Das 28 amostras positivas pela RT-PCR somente quatro haviam sido detectadas por EGPA, reiterando a sensibilidade da RT-PCR para detecção de baixos títulos virais

(<10⁵ partículas/mL de fezes) (OTTO et al., 2006). De acordo com Kohno et al. (2000) o limite de detecção do rotavírus em fezes de crianças pela EGPA foi o equivalente a 10⁸ partículas/mL de fezes. No entanto, os resultados positivos na EGPA são significativos, pois refletem a alta excreção de partículas virais indicando uma infecção aguda recente (HERRING et al., 1982; TODD et al., 1980).

Considerando a faixa etária, vários relatos indicam a maior ocorrência de AvRV nas duas primeiras semanas de idade em frangos de corte (AHMED e AHMED, 2006; DECAESSTECKER et al., 1988; ISLAM et al., 2009; KARIM et al., 2007a; MASCARENHAS et al., 2016; TAMEHIRO et al., 2003). Embora as amostras do presente estudo representem uma faixa de variação estreita em relação à idade (7 a 14 dias), a ocorrência das espécies AvRV-D e AvRV-F foram estatisticamente maiores no grupo etário 7 a 9 dias, enquanto o AvRV-A foi detectado somente no grupo etário 13 a 14 dias. A não detecção de AvRV-A nas aves de 7 a 9 dias corrobora os achados de McNulty et al. (1983) em um estudo longitudinal, onde o AvRV-A não foi excretado nas excretas de aves com menos de 14 dias.

Em contrapartida, estudos conduzidos no estado do Pará relataram maior ocorrência do AvRV-D em frangos de corte entre 16 a 30 dias, e AvRV-A entre 30 a 45 dias (BEZERRA et al., 2014; SILVA et al., 2013). Entretanto, uma vez que estes autores utilizaram a RT-PCR como método diagnóstico, esta comparação deve ser realizada com parcimônia. De qualquer forma é notória a multifatorialidade da rotavirose aviária, pois além dos fatores do próprio hospedeiro, o curso das infecções sofre influência direta do manejo empregado e estresse ambiental (MCNULTY et al., 1984b; SILVA et al., 2013).

Na avaliação morfométrica, a infecção pelo AvRV-A em aves de 13 e 14 dias apresentou diferença estatística em relação ao grupo controle no comprimento dos vilos e na razão vilo/cripta da porção P1 do intestino delgado. Além disso, foi observada uma maior presença de lesões moderadas a acentuadas nas porções P1 e P2, correspondentes àquelas com maior concentração de partículas virais descritas por McNulty et al. (1983). As lesões de espessamento, atrofia e fusão de vilos, presença de granulócitos e infiltrado inflamatório na lâmina própria, embora mais acentuadas, estavam localizadas nas mesmas porções descritas por Meulemans et

al. (1985) que relataram lesões discretas de infiltrado inflamatório de lâmina própria e moderada atrofia de vilosidades.

Nas infecções por AvRV-D foram observadas lesões nas três porções de intestino avaliadas. O grupo etário de 7 a 9 dias foram observadas lesões mais evidentes na porção P3 à análise descritiva, ainda que não houve diferença estatística, esse dado é compatível com o relato de McNulty et al. (1983), em que as partículas virais do AvRV-D estavam presentes desde as porções mais craniais do intestino delgado (correspondente às porções P1 e P2), atingindo maior concentração na porção cranial ao resquício do saco vitelínico (correspondente à porção P3) e mantendo essa maior concentração viral na porção distal ao resquício do saco vitelínico. Em faisões, as lesões induzidas pelo AvRV-D foram similares nas porções do duodeno, jejuno e íleo proximal, porém com marcante gravidade nas duas primeiras (HAYNES et al., 1994).

Os frangos infectados por AvRV-D apresentaram atrofia e redução da razão vilo/cripta nas três porções, quando comparados aos controles. Entretanto, só houve diferença significativa na razão vilo/cripta das porções P1 e P2 em aves com idade entre 7 a 9 dias, e no comprimento de vilos da P1 em aves com idade entre 13-14 dias. Estes resultados demonstraram uma infecção mais branda quando comparado ao quadro de atrofia acentuada do AvRV-D relatado por Otto et al. (2006). Entretanto a severidade relatada pelos autores, pode ter sido ocasionada em consequência da infecção mista do AvRV-D com AvRV-A.

Na análise histopatológica dos frangos refugo entre 13 e 14 dias de idade infectadas com AvRV-F, as lesões se apresentaram em grau leve a moderado, com atrofia de vilos significativa na porção P1. Nas aves entre 7 a 9 dias foi possível verificar alterações de grau leve a moderado em todas as porções, com maior evidência de espessamento, atrofia e fusão de vilos nas porções P2 e P3. Porém, na avaliação morfométrica a redução da relação vilo/cripta só apresentou significância estatística na porção P1 das aves entre 7 a 9 dias. Pouco se sabe a respeito da patogenia e epidemiologia das infecções por AvRV-F. Esta espécie já foi identificada tanto em aves assintomáticas e sem atrofia severa, como em lotes de frango de corte com histórico de SMA e acentuada atrofia de vilos. Esta, quando

presente, ocorreu em porções do jejuno correspondentes às porções P2 e P3 do presente estudo (OTTO et al., 2006).

Uma vez que o estudo foi realizado à campo sob condições naturais é impossível prever o tempo da infecção viral na ave acometida. Um estudo com infecção experimental de leitões e quantificação simultânea do RV em associação às alterações no intestino delgado demonstraram que o pico de concentração viral precede a redução da razão vilo/cripta no curso infeccioso do RV no hospedeiro (CROUCH e WOODE, 1978). Assim, apesar de termos obtido diferenças significativas na redução da relação vilo/cripta em algumas porções, não é descartada a possibilidade de que maiores reduções pudessem ser observadas caso a avaliação morfológica fosse realizada num momento posterior, principalmente quando são utilizadas técnicas pouco sensíveis como a EGPA.

Em relação à performance zootécnica dos lotes, a maior taxa de detecção de AvRV foi observada em frangos de corte alojados em lotes de IEP ruim com diferença estatística significativa em relação aos lotes de IEP bom, conforme a classificação pela empresa integradora. A estratificação das propriedades por IEP reflete o desempenho zootécnico do lote e sofre influência direta das falhas de biossegurança e práticas de manejo, estresse ambiental e imunidade das aves (BERCHIERI et al., 2009). Embora não haja trabalhos correlacionando a presença de AvRV com índices zootécnicos, Silva et al. (2013) relataram maior ocorrência de AvRV em aviários com alta densidade de aves/m², condição que magnifica o estresse das aves e facilita a propagação do AvRV. A detecção de AvRV em amostras de cama de IEP regular e ruim sustenta a influência das falhas de biossegurança, bem como reforça a importância do correto manejo de reutilização da cama de aviário (BERCHIERI et al., 2009; DINIZ et al., 2015).

Uma vez que o desempenho das aves de produção depende da saúde do trato intestinal, os problemas entéricos que afetam o rendimento geral do lote resultam em consequentes perdas econômicas (BARNES et al., 2000; DAY et al., 2015; LISTER, 2006; REBEL et al., 2006). A SMA é uma doença entérica que provoca perdas econômicas significativas para os produtores de aves em todo o mundo e acomete principalmente frangos de corte de até duas semanas de idade (FARMER, 1985; MARTLAND, 1989). Embora a etiologia da SMA permaneça

desconhecida, tem sido proposto que vários agentes virais estejam envolvidos no desenvolvimento desta síndrome. Entre as consequências da SMA, inclui a refugagem dos animais e desuniformidade dos lotes, refletindo diretamente no IEP. (KANG et al., 2012). A expressiva detecção de AvRV em aves refugos com sinais de SMA (tamanho reduzido, prostração, cloaca com excretas aderidas e penas eriçadas) e a presença de lesões no intestino não constitui um indicador independente para a ocorrência da SMA, porém, a correlação significativa com lotes de IEP ruim demonstra um indicativo da participação do AvRV na etiologia da SMA.

As lesões histopatológicas do intestino delgado encontradas tais como: espessamento, atrofia e fusão de vilos, abscesso de cripta, apoptose de enterócitos presença de granulócitos e infiltrado inflamatório de lâmina própria em diferentes graus foram compatíveis com a descrição das lesões da SMA em trabalhos experimentais e amostras de campo (OTTO et al., 2006; QAMAR et al., 2013; REBEL et al., 2006; REECE e FRAZIER, 1990).

Entretanto, uma vez que as amostras não foram avaliadas quanto à presença de outros agentes entéricos patogênicos já relacionados à SMA (parvovírus, reovírus, coronavírus, astrovírus, adenovírus, picobirnavírus), qualquer inferência conclusiva é prematura (DECAESSTECKER et al., 1986; MCNULTY et al., 1984a; REBEL et al., 2006; ZSACK et al., 2013).

5.5 Conclusão

Os levantamentos epidemiológicos em frangos de linhagem de corte com sinais de SMA, associados à refugagem e performance zootécnica são ausentes no Brasil. Embora novos indícios da associação do AvRV com a SMA tenham sido apontados, futuras investigações ainda são necessárias para esclarecer o papel efetivo do AvRV na etiologia e patogenia da SMA.

5.6 Referências

ABPA – Associação Brasileira de Proteína Animal. **Relatório anual, 2016**. Disponível em: < http://abpa-br.com.br/storage/files/versao_final_para_envio_digital_1925a_final_abpa_relatorio_anual_2016_portugues_web1.pdf> Acesso em: 22 setembro de 2015.

AHMED, M.S.; AHMED, M.U. Detection of avian rotavirus-like virus in broiler chickens in Bangladesh. **Bangladesh Journal Veterinary Medicine**, v.4, n.2, p.73-77, 2006.

ALAM, M.N.; ALAM, M.M.; NAHAR, A.; KOBAYASHI, N. Molecular epidemiological studies on rotavirus infection causing severe diarrhea in human, animals and poultry. **Bangladesh Journal Veterinary Medicine**, v.9, n.2, p.167-175, 2011.

ALFIERI, A.A.; PARAZZI, M.E.; TAKIUCHI, E.; MÉDICI, K.C.; ALFIERI, A.F. Frequency of group A rotavirus in diarrhoeic calves in Brazilian cattle herds, 1998–2002. **Tropical Animal Health and Production**, v.38, n.7-8, p.521-526, 2006.

ALFIERI, A.F.; RESENDE, M.; RESENDE, J.S.; ALFIERI, A.A. Atypical rotavirus infections among broiler chickens in Brazil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*.v.41. p.81-82. 1989. In: TAMEHIRO, C.Y.; ALFIERI, A.F.; MÉDICI, K.C.; ALFIERI, A.A. Segmented double stranded genomic RNA viruses in fecal samples from broiler chicken. **Brazilian Journal of Microbiology**,v.34, n.4, p.344-348, 2003.

ALFIERI, A.F.; TAMEHIRO, C.Y.; ALFIERI, A.A. Vírus entéricos RNA fita dupla, segmentado, em aves: Rotavírus, Reovírus e Picobirnavírus. **Semina: Ciências Agrárias**, v.21, n.1, p.101-103, 2000.

AVILA, V.S.; JAENISCH, F.R.F.; PIENIZ, L.C.; LEDUR, M.C.; ALBINO, L.F.T.; OLIVEIRA, P.A.V. **Produção e manejo de frangos de corte**. Concórdia: EMBRAPA-CNPSA, 1992. 43p.

BARNES, H.J.; GUY, J.S.; VAILLANCOURT, J.P. Poultry enteritis complex. **Scientific and Technical Review OIE**, n.19, v.2, p.565-588, 2000.

BELUSSO, D.; HESPANHOL A.N. A evolução da avicultura industrial brasileira e seus efeitos territoriais. **Revista Percorso - NEMO**. Maringá. v.2, n.1, p.25-51, 2010.

BERCHIERI, A.; SILVA, E.N.; DIFÁBIO, J.; SESTI, L.; ZUANAZE, M.A.F. Reovirose e Rotavirose – Adenovirose, reovirose, rotavirose e virose intestinais. **Doença das aves**. 2ed.Campinas: Fundação APINCO de ciência e tecnologia avícolas. 2009. Cap 5.6.

BESERRA, L.A.R.; BARBOSA, B.R.P.; BERNARDES, N.T.C.G.; BRANDÃO, P.E.; GREGORI, F. Occurrence and characterization of rotavirus A in broilers, layers, and broiler breeders from Brazilian poultry farms. **Avian diseases**, v.58, n.1, p.153–157, 2014a.

BESERRA, L.A.R.; BARBOSA, B.R.P.; BERNARDES, N.T.C.G.; BRANDÃO, P.E GREGORI, F. Research Note — Description of rotavirus F in broilers from Brazilian poultry farms. **Avian Diseases**, v.1, n.3, p.458–461, 2014b.

BEZERRA, D.A.M.; SILVA, R.R.; KAIANO, J.H.L.; SILVESTRE, R.V.D.; OLIVEIRA, D.S.; LINHARES, A.C.; GABBAY, Y.B.; MASCARENHAS, J.D.P. Detection of avian group D rotavirus using the polymerase chain reaction for the VP6 gene. **Journal of Virological Methods**, v.185, p.189-192, 2012.

BEZERRA, D.A.; DA SILVA, R.R.; KAIANO, J.H.; DE SOUZA OLIVEIRA, D.; GABBAY, Y.B.; LINHARES, A.C.; MASCARENHAS, J.D. Detection, epidemiology and characterization of VP6 and VP7 genes of group D rotavirus in broiler chickens. **Avian Pathology**, v.43, n.3, p.238–243, 2014.

BOOM, R.; SOL, C.J.A.; SALIMANS, M.M.M.; JANSEN, C.L.; WERTHEIM-vanDILLEN, P.M.E.; VAN DER NOORDAA, J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **Journal of Clinical Microbiology**, v.28, n.3, p.495-503, 1990.

CROUCH, C.F.; WOODE, G.N. Serial studies of virus multiplication and intestinal damage in gnotobiotic piglets infected with rotavirus. **Journal of Medical Microbiology**, v.11, 1978.

DAY, J.M.; OAKLEY, B.B.; SEAL, B.S.; ZSAK, L. Comparative analysis of the intestinal bacterial and rna viral communities from sentinel birds placed on selected broiler chicken farms. **Plos One**, v.10, n.1, 2015.

DECAESSTECKER, M.; CHARLIER, G.; MEULEMANS, G. Epidemiological study of enteric viruses in broiler chickens: Comparison of tissue culture and direct electron microscopy. **Avian Pathology**, v.17, n.2, p.477-486, 1988.

DECAESSTECKER, M.; CHARLIER, G.; MEULEMANS, G. Significance of parvoviruses, entero-likeviruses and reoviruses in the aetiology of chicken mal absorption syndrome. **Avian Pathology**, v.15, p.769–782, 1986.

DINIZ, T.T.; MELLO, J.L.M.; GRANJA-SALCEDO, Y.T. Temperatura do ambiente e reutilização da cama no desempenho e qualidade da carne de frango. **Ciência & Tecnologia: FATEC-JB**, v.7, n.1, p.47-62, 2015.

ESTES, M.K.; KAPIKIAN, A.Z. Rotaviruses. In: Knipe, D.M.; Howley, P.M. (ed.) **Fields Virology**. 5 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. p.1917-1974.

FARMER, A. Stunting syndrome of broilers. *Veterinary Record*, v.117, n.154, 1985. In: KHAN, S.A.; MUSTAFA, G.; CHAUDHRY, R.A.; IGBAL, M.; KHAN, M.I. Infectious stunting syndrome of broiler chicks: clinical signs and pathological lesions. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v.8, n.1, p.1-6, 1995.

GUY, J. Virus infections of the gastrointestinal tract of poultry. **Poultry Science**, v.77, p.1166-1175, 1998.

HAYNES, J.S.; REYNOLDS, D.L.; FAGERLAND, J.A.; SIX, A.S. Morphogenesis of enteric lesions induced by group D rotavirus in ringneck pheasant chicks (*Ptilasianus colchicus*). **Veterinary Pathology**, v.31, p.74-81, 1994.

HERRING, A.J.; INGLIS, N.F.; OJEH, C.K.; SNODGRASS, D.R.; MENZIES, J.D. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver stained polyacrilamide gels. **Journal of Clinical Microbiology**, v.16, n.3, p.473-477, 1982.

ICTV – International Committee on Taxonomy of Viruses. **Official ICVT 2014 taxonomy**. 2014. Disponível em: <www.ictvonline.org/virustaxonomy.asp> Acesso em: 28 outubro 2015.

ISLAM, M.S.; ALAM, M.M.; AHMED, M.U.; SAIFUZZAMAN, A.B.M.; KOBAYASHI, N.; KAYESH, M.E.H.; UDDIN, M.S. Molecular epidemiologic study on rotavirus infection in human and birds in association with gastroenteritis. **Bangladesh Journal Veterinary Medicine**, v.7, n.1, p.233-237, 2009.

JOHNE, R.; OTTO, P.; ROTH, B.; LÖHREN, U.; BELNAP, D.; REETZ, J. TROJNAR, E. Sequence analysis of the VP6-encoding genome segment of avian group F and G rotaviruses. **Virology**, v.412, p.384-391, 2011.

KANG, K.; EL-GAZZAR, M.; SELLERS, H.S.; DOREA, F.; WILLIAMS, S.M.; KIM, T.; COLLETT, S.; MUNDT, E. Investigation into the aetiology of runting and stunting syndrome in chickens. **Avian Pathology**, v.41, n.1, p.41-50, 2012.

KARIM, M.R.; RUME, F.I.; ALAM, M.M.; AHMED, M.U.; CHOWDHURY, A.K. Survey on the distribution of avian rotavirus by polyacrylamide gel electrophoresis. **Thai Journal of Agricultural Science**, v.40, n.3-4, p.151-157, 2007a.

KARIM, M.R.; RUME, F.I.; ALAM, M.M.; AHMED, M.U. Molecular epidemiologic study on avian rotavirus prevailing in Bangladesh. **Bangladesh Journal Veterinary Medicine**, v.5, n.1&2, p.43-48, 2007b.

KATTOOR, J.J.; SHARMA, K.; KUMER, N.; BATRA, M.; JINDAL, N.; YADAV, A.S.; MALIK, Y.S. Distribution frequency of avian rotaviruses in India, 2011–2013. **Advances in Animal and Veterinary Sciences**, v.5, p.148 – 150, 2013.

KOHNO, H.; AKIHARA, S.; NISHIO, O.; USHIJIMA, H. Development of a simple and rapid latex test for rotavirus in stool samples. **Pediatrics International**, v.42, p.395-400, 2000.

LISTER, S.A. Gut problems: the field experience and what it means to the poultry farmer In: PERRY, G.C (Org.). **Avian gut function in health and disease**. 28 ed. Cambridge: CABI, 2006. p.350-360.

LUNA, L.G. **Manual of the histologic staining methods of the armed forces institute of pathology**. 3.ed. New York: McGraw Hill, 1968, 258p.

MALIK, Y.S.; KUMAR, N.; SHARMA, K.; SHARMA, R.; KUMAR, H.B.; ANUPAMLAL, K.; KUMARI, S.; SHUKLA, S.; CHANDRASHEKAR, K.M. Epidemiology and genetic diversity of rotavirus strains associated with acute gastroenteritis in bovine, porcine, poultry and human population of Madhya Pradesh, Central India, 2004-2008. **Advances in Animal and Veterinary Sciences**, v.1, n.4, p.111-115, 2013.

MARTLAND, M.F. Advances in stunting and runting syndrome research. Progress in Veterinary Microbiology and Immunology Journal. v. 5, p. 108-131. 1989. In: KHAN, S.A.; MUSTAFA, G.; CHAUDHRY, R.A.; IGBAL, M.; KHAN, M.I. Infectious stunting syndrome of broiler chicks: clinical signs and pathological lesions. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v.8, n.1, p.1-6, 1995.

MASCARENHAS, J.D.P.; BEZERRA, D.A.M.; SILVA, R.R.; SILVA, M.J.M.; SOUSA, E.C.; SOARES, L.S. Brief report – Detection of the VP6 gene of group F and G rotaviruses in broiler chicken fecal samples from the Amazon region of Brazil. **Archives of Virology**, 2016.

MCNULTY, M.S.; REYNOLDS, D.L. Viral enteric infections – Rotavirus Infections. In: SAIF, Y.M.; FADLY, A.M.; GLISSON, J.R.; MCDUGALD, L.R.; NOLAN, L.K.; SWAYNE, D.E. **Diseases of Poultry**. 12ed. USA: Blackwell Publishing, 2008. p.329-350.

MCNULTY, M. S.; TODD, D.; ALLAN, G.M.; MCFERRAN, J.B.; GREENE, J.A. Epidemiology of rotavirus infection in broiler chickens: recognition of four serogroups. **Archives of Virology**, v.81, p.113–121, 1984b.

MCNULTY, M.S.; ALLAN, G.M.; CONNOR, T.J.; MCFERRAN, J.B.; MCCRACKEN, R.M. An entero-like virus associated with the runting syndrome in broiler chickens. **Avian Pathology**, v.13. p.429-439, 1984a.

MCNULTY, M. S.; ALLAN, G.M.; MCCRACKEN, R.M. Experimental infection of chickens with rotaviruses: clinical and virological findings. **Avian Pathology**, v.12, p.45–54, 1983.

MEULEMANS, G.; PEETERS, J.E.; HALEN, P. Experimental Infection of broiler chickens with rotavirus. **British Veterinary Journal**, v.141, n.1, p.69-73, 1985.

OTTO, P.; AHMED, M.U.; HOTZEL, H.; MACHNOWSKA, P.; REETZ, J.; ROTH, B.; TROJNAR, E.; JOHNE, R. Detection of avian rotaviruses of groups A, D, F and G in diseased chickens and turkeys from Europe and Bangladesh. **Veterinary Microbiology**, v.156, p.8–15, 2012.

OTTO, P.; LIEBLER-TENORIO, E.M.; ELSCHNER, M., REETZ, J.; LOHREN, U.; DILLER, R. Detection of rotaviruses and intestinal lesions in broiler chicks from flocks with runting and stunting syndrome (RSS). **Avian Diseases**, v.50, p.411–418, 2006.

PANTIN-JACKWOOD, M.J.; SPACKMAN, E.; DAY, J.M.; RIVES, D. Periodic monitoring of commercial turkeys for enteric viruses indicates continuous presence of astrovirus and rotavirus on the farms. **Avian Diseases**, n.51, p.674–680, 2007.

PEREIRA, H.G.; AZEREDO, R.S.; LEITE, J.P.G; CANDEIAS, J.A.N.; RÁCZ, M.L.; LINHARES, A.C.; GABBAY, Y.B.; TRABULSI, J.R. Eletrophoretic study of the genome of human rotaviruses from Rio de Janeiro, São Paulo and Pará, Brazil. **The Journal of Hygiene**, v.90, p.117-125, 1983.

QAMAR, M.F.; ASLAM, H.; JAHAN, N. Histopathological studies on stunting syndrome in broilers, Lahore, Pakistan. **Veterinary Medicine International**, ID 212830, 2013.

REBEL, J.M.J.; BALK, F.R.M.; POST, J.; VAN HEMERT, S.; ZEKARIAS, B.; STOCKHOFE, N. Malabsorption syndrome in broilers. **World's Poultry Science Journal**, v.62, p.17-29, 2006.

REECE, R.L.; FRAZIER, J.A. Infectious stunting syndrome of chickens in great britain: field and experimental studies. **Avian Pathology**, v.19, n.4, p.723-758, 1990.

RIOS, R.L.; MARIN, S.Y.; GOMES, A.M.; RESENDE, J.S.; BONFIM, M.R.Q.; GOMES, A.D.; RESENDE, F.M.S.; HORTA, R.S.; RESENDE, M.; MARTINS, N.R.S. The occurrence of Orthoreovirus, Rotavirus and chicken anemia virus in chickens of the poultry industry in Minas Gerais, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.64, n.6, p.1613-1620, 2012.

ROSEN, B.I.; FANG, Z.Y.; GLASS, R.I.; MONROE, S.S. Cloning of human picobirnavirus genomic segments and development of an RT-PCR detection assay. **Virology**, v.277, p.316-329, 2000.

SAIF, Y.M.; FADLY, A.M.; GLISSON, J.R.; MCDUGALD, L.R.; NOLAN, L.K.; SWAYNE, D.E. **Diseases of Poultry**. 12 ed. USA:Blackwell Publishing. 2008.

SAVITA; KUSUMAKAR, A.L.; MALIK, Y.P.S.; MINAKSHI; PRASAD, G. Detection and characterization of group A and D avian rotaviruses in India. **Indian Journal of Biotechnology**, v.7, p.554-556, 2008.

SCHUMANN, T.; HOTZEL, H.; OTTO, P.; JOHNE, R. Evidence of interspecies transmission and reassortment among avian group A rotaviruses. **Virology**, v.386. p.334-343, 2009.

SILVA, R.R.; BEZERRA, B.A.M.; KAIANO, J.H.L; MANNO, M.C.; OLIVEIRA, D.S.; SAGICA, F.E.S.; GABBAY, Y.B.; CHAVES, S.O.C.; SILVA, A.L.C.; ALFIERI, A.A.; MASCARENHAS, J.D.P. Molecular epidemiology of avian rotavirus in fecal samples of broiler chickens in Amazon Region, Brazil, from August 2008 to May 2011. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v.4, n.2, p.55-62, 2013.

TAMEHIRO, C.Y.; ALFIERI, A.F.; MÉDICI, K.C.; ALFIERI, A.A. Segmented double stranded genomic RNA viruses in fecal samples from broiler chicken. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.34, n.4, p.344-348, 2003.

TODD, D.; MCNULTY, M.S.; ALLAN, G.M. Polyacrylamide gel electrophoresis of avian rotavirus RNA. **Archives of Virology**, v.63, p.87-97, 1980.

TODD, D.; MCNULTY, M.S. Eletrophoretic variation of avian rotavirus RNA in polyacrylamide gels. **Avian Pathology**, v.15, n.1, p.149-159, 1986.

VILLARREAL, L.Y.B.; ULIANA, G.; VALENZUELA, C.; CHACÓN, J.L.V.; SAIDENBERG, A.B.S.; SANCHES, A.A.; BRANDÃO, P.E.; JEREZ, J.A.; FERREIRA, A.J.P. Rotavirus detection and isolation from chickens with or without symptoms. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v.8, n.3, p.187-191, 2006.

YASON, C.V.; SCHAT, K.A. Pathogenesis of rotavirus infection in turkey poults. **Avian Pathology**, v.15, p.421-435, 1986.

ZSACK, L.; CHA, R.M.; DAY, J.M. Chicken parvovirus–induced runting-stunting syndrome in young broilers. **Avian Diseases**, v.57, p.123-127, 2013.

6 CONCLUSÕES GERAIS

- A ocorrência das espécies AvRV-A, AvRV-D e AvRV-F a partir do conteúdo entérico de frangos de corte refugos, com sinais de SMA, foi comprovada pela EGPA nos aviários comerciais do município de Palotina, Paraná. A maior frequência de ocorrência foi do AvRV-F, seguido pelo AvRV-D e AvRV-A.
- Em amostras de conteúdo entérico de aves clinicamente saudáveis foi possível detectar AvRV-A, e AvRV-D.
- A ocorrência do AvRV em animais refugos foi estatisticamente significativo nos lotes de IEP ruim em comparação aos lotes de IEP bom.
- Nas amostras de cama o AvRV-F foi detectado em uma amostra de lote com IEP regular, e em duas camas de lotes distintos com IEP ruim foi detectado AvRV-A e AvRV-F.
- As alterações histopatológicas foram compatíveis com patogenia do AvRV e a SMA; com maior severidade nos casos associados à infecção pelo AvRV-A.
- A redução no comprimento dos vilos foi significativa nas aves naturalmente infectadas pelas três espécies AvRV-A, AvRV-D e AvRV-F na porção P1.
- A relação vilo/cripta apresentou redução significativa na porção P1 nas aves naturalmente infectadas por AvRV-A e AvRV-F, e nas porções P1 e P2 das aves infectadas com AvRV-D.
- A expressiva detecção de AvRV em aves refugos com sinais de SMA e significativa presença do AvRV nos lotes de IEP ruim demonstra uma possível participação do AvRV na etiologia da SMA.

7 APÊNDICES

APÊNDICE A: Relação das amostras de conteúdo entérico de frangos refugos em lotes de IEP bom, avaliadas no período de estudo e os resultados obtidos.

Data Coleta	Lote/ idade (dias)	Código amostra	Diagnóstico de AvRV e PBV por EGPA						Análise Histopatológica
			RV	AvRV A	AvRV D	AvRV F	PBV	Inconclusivo	
13/02/2015	A/14	A 01	+	nd	nd	+	+	nd	R
13/02/2015	A/14	A 02	nd	nd	nd	nd	Nd	nd	NR
13/02/2015	A/14	A 03	+	nd	nd	+	Nd	nd	R
13/02/2015	A/14	A 04	nd	nd	nd	nd	Nd	nd	NR
13/02/2015	A/14	A 05	+	nd	nd	+	Nd	nd	R
13/02/2015	A/14	A 06 *	nd	nd	nd	nd	Nd	nd	R
13/02/2015	A/14	A 07	+	nd	nd	+	Nd	nd	R
13/02/2015	A/14	A 08	nd	nd	nd	nd	Nd	nd	NR
13/02/2015	A/14	A 09	+	nd	+	nd	Nd	nd	R
13/02/2015	A/14	A 10	nd	nd	nd	nd	+	nd	R
13/02/2015	A/14	A 11	nd	nd	nd	nd	Nd	nd	NR
13/02/2015	A/14	A 12	nd	nd	nd	nd	Nd	nd	NR
13/02/2015	A/14	A 13	nd	nd	nd	nd	Nd	nd	NR
13/02/2015	A/14	A 14	nd	nd	nd	nd	Nd	nd	NR
13/02/2015	A/14	A 15	nd	nd	nd	nd	Nd	nd	NR
13/02/2015	A/14	A 16	nd	nd	nd	nd	Nd	nd	NR
13/02/2015	A/14	A 17	nd	nd	nd	nd	Nd	nd	NR
13/02/2015	A/14	A 18 *	nd	nd	nd	nd	Nd	nd	R
13/02/2015	A/14	A 19	+	nd	nd	+	Nd	nd	NR
13/02/2015	A/14	A 20	+	nd	nd	+	Nd	nd	R

13/02/2015	A/14	A 21	nd	nd	nd	nd	Nd	nd	NR
13/02/2015	A/14	A 23	+	nd	+	nd	Nd	nd	R
13/02/2015	A/14	A 24	nd	nd	nd	nd	Nd	nd	NR
27/02/2015	B/08	B 28	nd	nd	nd	nd	Nd	nd	NR
27/02/2015	B/08	B 29	nd	nd	nd	nd	Nd	nd	NR
27/02/2015	B/08	B 30	nd	nd	nd	nd	Nd	nd	NR
27/02/2015	B/08	B 31	nd	nd	nd	nd	Nd	nd	NR
27/02/2015	B/08	B 32	nd	nd	nd	nd	Nd	nd	NR
27/02/2015	B/08	B 33	nd	nd	nd	nd	Nd	nd	NR
27/02/2015	B/08	B 34	nd	nd	nd	nd	Nd	nd	NR
27/02/2015	B/08	B 35	nd	nd	nd	nd	Nd	nd	NR
27/02/2015	B/08	B 36	nd	nd	nd	nd	Nd	nd	NR
27/02/2015	B/08	B 37	nd	nd	nd	nd	Nd	nd	NR
27/02/2015	B/08	B 38 *	nd	nd	nd	nd	Nd	nd	R
27/02/2015	B/08	B 39 *	nd	nd	nd	nd	Nd	nd	R
27/02/2015	B/08	B 40	nd	nd	nd	nd	Nd	+	NR
27/02/2015	B/08	B 41	nd	nd	nd	nd	Nd	+	NR
27/02/2015	B/08	B 42	nd	nd	nd	nd	Nd	nd	NR
27/02/2015	B/08	B 43	nd	nd	nd	nd	Nd	+	NR
27/02/2015	B/08	B 44	nd	nd	nd	nd	Nd	+	NR
27/02/2015	B/08	B 45	nd	nd	nd	nd	Nd	nd	NR
27/02/2015	B/08	B 46	nd	nd	nd	nd	Nd	nd	NR
27/02/2015	B/08	B 47	nd	nd	nd	nd	Nd	nd	NR
27/02/2015	B/08	B 48	nd	nd	nd	nd	Nd	nd	NR
27/02/2015	B/08	B 49	nd	nd	nd	nd	Nd	nd	NR
27/02/2015	B/08	B 50	nd	nd	nd	nd	Nd	+	NR
27/02/2015	B/08	B 51	nd	nd	nd	nd	Nd	nd	NR
27/02/2015	C/08	C 55	nd	nd	nd	nd	Nd	nd	NR
27/02/2015	C/08	C 56	nd	nd	nd	nd	Nd	nd	NR
27/02/2015	C/08	C 57	nd	nd	nd	nd	Nd	+	NR

27/02/2015	C/08	C 58	nd	nd	nd	nd	Nd	nd	NR
27/02/2015	C/08	C 59 *	nd	nd	nd	nd	Nd	+	R
27/02/2015	C/08	C 60	nd	nd	nd	nd	Nd	+	NR
27/02/2015	C/08	C 61	nd	nd	nd	nd	Nd	nd	NR
27/02/2015	C/08	C 62	nd	nd	nd	nd	Nd	nd	NR
27/02/2015	C/08	C 63	+	nd	nd	+	Nd	nd	R
27/02/2015	C/08	C 64	nd	nd	nd	nd	Nd	nd	NR
27/02/2015	C/08	C 65 *	nd	nd	nd	nd	Nd	nd	R
27/02/2015	C/08	C 66	nd	nd	nd	nd	Nd	nd	NR
27/02/2015	C/08	C 67	+	nd	nd	+	Nd	nd	R
27/02/2015	C/08	C 68	nd	nd	nd	nd	Nd	nd	NR
27/02/2015	C/08	C 69	nd	nd	nd	nd	Nd	nd	NR
27/02/2015	C/08	C 70	nd	nd	nd	nd	Nd	+	NR
27/02/2015	C/08	C 71	nd	nd	nd	nd	Nd	nd	NR
27/02/2015	C/08	C 72	nd	nd	nd	nd	Nd	nd	NR
27/02/2015	C/08	C 73	nd	nd	nd	nd	Nd	nd	NR
27/02/2015	C/08	C 74	nd	nd	nd	nd	Nd	+	NR
27/02/2015	C/08	C 75	+	nd	nd	nd	Nd	nd	R
27/02/2015	C/08	C 76	nd	nd	nd	nd	Nd	nd	NR
27/02/2015	C/08	C 77	nd	nd	nd	nd	Nd	nd	NR
27/02/2015	C/08	C 78	nd	nd	nd	nd	Nd	nd	NR
15/10/2015	D/13	D 82	nd	nd	nd	nd	Nd	nd	NR
15/10/2015	D/13	D 83	nd	nd	nd	nd	Nd	nd	NR
15/10/2015	D/13	D 84	nd	nd	nd	nd	Nd	nd	NR
15/10/2015	D/13	D 85	nd	nd	nd	nd	Nd	nd	NR
15/10/2015	D/13	D 86	nd	nd	nd	nd	Nd	nd	NR
15/10/2015	D/13	D 87	nd	nd	nd	nd	Nd	nd	NR
15/10/2015	D/13	D 88	nd	nd	nd	nd	Nd	nd	NR
15/10/2015	D/13	D 89	nd	nd	nd	nd	Nd	nd	NR
15/10/2015	D/13	D 90	nd	nd	nd	nd	Nd	nd	NR

15/10/2015	D/13	D 91	nd	nd	nd	nd	Nd	nd	NR
15/10/2015	D/13	D 92	nd	nd	nd	nd	Nd	nd	NR
15/10/2015	D/13	D 93	nd	nd	nd	nd	Nd	nd	NR
15/10/2015	D/13	D 94	nd	nd	nd	nd	Nd	nd	NR
15/10/2015	D/13	D 95	nd	nd	nd	nd	Nd	nd	NR
15/10/2015	D/13	D 96	nd	nd	nd	nd	Nd	nd	NR
15/10/2015	D/13	D 97	nd	nd	nd	nd	Nd	nd	NR
15/10/2015	D/13	D 98	nd	nd	nd	nd	Nd	nd	NR
15/10/2015	D/13	D 99	nd	nd	nd	nd	Nd	nd	NR
15/10/2015	D/13	D 100	nd	nd	nd	nd	Nd	nd	NR
15/10/2015	D/13	D 101	nd	nd	nd	nd	Nd	nd	NR
15/10/2015	D/13	D 102	nd	nd	nd	nd	Nd	nd	NR
15/10/2015	D/13	D 103	+	+	nd	nd	Nd	nd	R
15/10/2015	D/13	D 104 *	nd	nd	nd	nd	Nd	+	R
15/10/2015	D/13	D 105 *	nd	nd	nd	nd	Nd	nd	R
Σ		85+8*	12	1	2	9	1	11	

* Ave controle; + = positivo; nd= Não detectado; NR= Não realizado; R= Realizado

APÊNDICE B: Relação das amostras de conteúdo entérico de frangos refugos em lotes de IEP regular, avaliadas no período de estudo e os resultados obtidos.

Data coleta	Lote/idade (dias)	Código amostra	Diagnóstico de AvRV e PBV por EGPA						Análise Histopatológica
			RV	AvRV A	AvRV D	AvRV F	PBV	Inconclusivo	
26/02/2015	E/09	E 109	nd	nd	nd	Nd	nd	nd	NR
26/02/2015	E/09	E 110	nd	nd	nd	Nd	nd	nd	NR
26/02/2015	E/09	E 111*	nd	nd	nd	Nd	nd	nd	R
26/02/2015	E/09	E 112*	nd	nd	nd	Nd	nd	nd	R
26/02/2015	E/09	E 113	nd	nd	nd	Nd	nd	nd	NR
26/02/2015	E/09	E 114	nd	nd	nd	Nd	nd	nd	NR
26/02/2015	E/09	E 115	nd	nd	nd	Nd	nd	nd	NR
26/02/2015	E/09	E 116	nd	nd	nd	Nd	nd	nd	NR
26/02/2015	E/09	E 117	nd	nd	nd	Nd	nd	nd	NR
26/02/2015	E/09	E 118	nd	nd	nd	Nd	nd	nd	NR
26/02/2015	E/09	E 119	nd	nd	nd	Nd	nd	nd	NR
26/02/2015	E/09	E 120	nd	nd	nd	Nd	nd	nd	NR
26/02/2015	E/09	E 121	nd	nd	nd	Nd	nd	nd	NR
26/02/2015	E/09	E 123	nd	nd	nd	Nd	nd	nd	NR
26/02/2015	E/09	E 124	nd	nd	nd	Nd	nd	nd	NR
26/02/2015	E/09	E 125	nd	nd	nd	Nd	nd	nd	NR
26/02/2015	E/09	E 126	nd	nd	nd	Nd	nd	nd	NR
26/02/2015	E/09	E 127	nd	nd	nd	Nd	nd	nd	NR
26/02/2015	E/09	E 129	nd	nd	nd	Nd	nd	nd	NR
26/02/2015	E/09	E 130	nd	nd	nd	Nd	nd	+	NR
26/02/2015	E/09	E 131	nd	nd	nd	Nd	nd	+	NR
26/02/2015	E/09	E 132	nd	nd	nd	Nd	nd	nd	NR
02/03/2015	F/09	F 136*	nd	nd	nd	Nd	nd	nd	R
02/03/2015	F/09	F 137*	nd	nd	nd	Nd	nd	nd	R
02/03/2015	F/09	F 138	nd	nd	nd	Nd	nd	nd	NR

02/03/2015	F/09	F 139	nd	nd	nd	Nd	nd	nd	NR
02/03/2015	F/09	F 140	nd	nd	nd	Nd	nd	nd	NR
02/03/2015	F/09	F 141	nd	nd	nd	Nd	nd	nd	NR
02/03/2015	F/09	F 142	nd	nd	nd	Nd	nd	nd	NR
02/03/2015	F/09	F 143	+	nd	nd	+	nd	nd	R
02/03/2015	F/09	F 144	nd	nd	nd	Nd	nd	nd	NR
02/03/2015	F/09	F 145	nd	nd	nd	Nd	nd	nd	NR
02/03/2015	F/09	F 146	nd	nd	nd	Nd	nd	nd	NR
02/03/2015	F/09	F 147	nd	nd	nd	Nd	nd	nd	NR
02/03/2015	F/09	F 148	nd	nd	nd	Nd	nd	nd	NR
02/03/2015	F/09	F 149	nd	nd	nd	Nd	nd	nd	NR
02/03/2015	F/09	F 150	nd	nd	nd	Nd	nd	nd	NR
02/03/2015	F/09	F 151	nd	nd	nd	Nd	nd	nd	NR
02/03/2015	F/09	F 152	nd	nd	nd	Nd	nd	+	NR
02/03/2015	F/09	F 153	nd	nd	nd	Nd	nd	nd	NR
02/03/2015	F/09	F 154	+	nd	nd	+	nd	nd	NR
02/03/2015	F/09	F 155	nd	nd	nd	Nd	nd	nd	NR
02/03/2015	F/09	F 156	nd	nd	nd	Nd	+	nd	R
02/03/2015	F/09	F 157	+	nd	nd	+	nd	nd	R
02/03/2015	F/09	F 158	nd	nd	nd	Nd	nd	nd	NR
02/03/2015	F/09	F 159	nd	nd	nd	Nd	nd	nd	NR
02/03/2015	G/09	G 163	nd	nd	nd	Nd	nd	+	NR
02/03/2015	G/09	G 164	+	nd	nd	+	nd	nd	NR
02/03/2015	G/09	G 165	nd	nd	nd	Nd	nd	+	NR
02/03/2015	G/09	G 166	+	nd	nd	+	nd	nd	R
02/03/2015	G/09	G 167	nd	nd	nd	Nd	nd	nd	NR
02/03/2015	G/09	G 168	+	nd	nd	+	+	nd	NR
02/03/2015	G/09	G 169	+	nd	nd	+	+	nd	R
02/03/2015	G/09	G 170	+	nd	nd	+	nd	nd	R
02/03/2015	G/09	G 171	nd	nd	nd	Nd	nd	nd	NR

02/03/2015	G/09	G 172	+	nd	nd	+	nd	nd	R
02/03/2015	G/09	G 173	nd	nd	nd	Nd	nd	nd	NR
02/03/2015	G/09	G 174	+	nd	nd	+	+	nd	NR
02/03/2015	G/09	G 175	+	nd	nd	+	+	nd	NR
02/03/2015	G/09	G 176	+	nd	nd	+	nd	nd	R
02/03/2015	G/09	G 177	+	nd	nd	+	nd	nd	NR
02/03/2015	G/09	G 178	nd	nd	nd	Nd	nd	nd	NR
02/03/2015	G/09	G 179	+	nd	nd	+	nd	nd	R
02/03/2015	G/09	G 180	+	nd	nd	+	nd	nd	R
02/03/2015	G/09	G 181	+	nd	nd	+	nd	nd	NR
02/03/2015	G/09	G 182	+	nd	nd	+	nd	nd	R
02/03/2015	G/09	G 185*	nd	nd	nd	Nd	nd	nd	NR
02/03/2015	G/09	G 186*	nd	nd	nd	Nd	nd	nd	NR
15/10/2015	H/14	H 190*	nd	nd	nd	Nd	nd	nd	R
15/10/2015	H/14	H 191*	nd	nd	nd	Nd	nd	+	R
15/10/2015	H/14	H 192	nd	nd	nd	Nd	+	nd	R
15/10/2015	H/14	H 193	nd	nd	nd	Nd	nd	nd	NR
15/10/2015	H/14	H 194	nd	nd	nd	Nd	nd	nd	NR
15/10/2015	H/14	H 195	nd	nd	nd	Nd	nd	nd	NR
15/10/2015	H/14	H 196	nd	nd	nd	Nd	nd	nd	NR
15/10/2015	H/14	H 197	nd	nd	nd	Nd	nd	nd	NR
15/10/2015	H/14	H 198	nd	nd	nd	Nd	nd	nd	NR
15/10/2015	H/14	H 199	nd	nd	nd	Nd	nd	nd	NR
15/10/2015	H/14	H 200	nd	nd	nd	Nd	nd	nd	NR
15/10/2015	H/14	H 201	nd	nd	nd	Nd	nd	nd	NR
15/10/2015	H/14	H 202	nd	nd	nd	Nd	nd	nd	NR
15/10/2015	H/14	H 203	+	+	nd	Nd	nd	nd	R
15/10/2015	H/14	H 204	nd	nd	nd	Nd	nd	nd	NR
15/10/2015	H/14	H 205	nd	nd	nd	Nd	nd	nd	NR
15/10/2015	H/14	H 206	+	+	nd	Nd	nd	nd	R

15/10/2015	H/14	H 207	nd	nd	nd	Nd	+	nd	R
15/10/2015	H/14	H 208	nd	nd	nd	Nd	nd	nd	NR
15/10/2015	H/14	H 209	nd	nd	nd	Nd	nd	nd	NR
15/10/2015	H/14	H 210	+	+	nd	Nd	nd	nd	R
15/10/2015	H/14	H 211	nd	nd	nd	Nd	nd	nd	NR
15/10/2015	H/14	H 212	nd	nd	nd	Nd	nd	nd	NR
15/10/2015	H/14	H 213	nd	nd	nd	Nd	+	nd	R
Σ		84+8*	24	3	nd	17	8	6	

* Ave controle; + = positivo; nd= Não detectado; NR= Não realizado; R= Realizado

APÊNDICE C: Relação das amostras de conteúdo entérico dos frangos refugos em lotes de IEP ruim, avaliadas no período de estudo e os resultados obtidos.

Data coleta	Lote/idade (dias)	Código amostra	Diagnóstico de AvRV e PBV por EGPA						Análise histopatológica
			RV	AvRV A	AvRV D	AvRV F	PBV	Inconclusivo	
13/02/2015	I/09	I 217	nd	nd	nd	nd	nd	nd	NR
13/02/2015	I/09	I 218	nd	nd	nd	nd	nd	nd	NR
13/02/2015	I/09	I 219	nd	nd	nd	nd	nd	nd	NR
13/02/2015	I/09	I 220	nd	nd	nd	nd	nd	nd	NR
13/02/2015	I/09	I 221	nd	nd	nd	nd	nd	nd	NR
13/02/2015	I/09	I 222	nd	nd	nd	nd	nd	nd	NR
13/02/2015	I/09	I 223	nd	nd	nd	nd	nd	nd	NR
13/02/2015	I/09	I 224	nd	nd	nd	nd	nd	nd	NR
13/02/2015	I/09	I 225	nd	nd	nd	nd	nd	nd	NR
13/02/2015	I/09	I 226	nd	nd	nd	nd	nd	nd	NR
13/02/2015	I/09	I 227	nd	nd	nd	nd	nd	nd	NR
13/02/2015	I/09	I 228	nd	nd	nd	nd	nd	nd	NR
13/02/2015	I/09	I 229*	nd	nd	nd	nd	nd	nd	R
13/02/2015	I/09	I 230	nd	nd	nd	nd	nd	nd	NR
13/02/2015	I/09	I 231	+	nd	nd	+	nd	nd	NR
13/02/2015	I/09	I 233	nd	nd	nd	nd	nd	nd	NR
13/02/2015	I/09	I 234	nd	nd	nd	nd	nd	nd	NR
13/02/2015	I/09	I 235	+	nd	nd	+	nd	nd	NR
13/02/2015	I/09	I 236	+	nd	nd	+	nd	nd	R
13/02/2015	I/09	I 237	nd	nd	nd	nd	nd	nd	NR
13/02/2015	I/09	I 238	nd	nd	nd	nd	nd	+	NR
13/02/2015	I/09	I 239	nd	nd	nd	nd	nd	+	NR
13/02/2015	I/09	I 240*	nd	nd	nd	nd	nd	nd	R
13/02/2015	J/09	J 244	nd	nd	nd	nd	nd	+	NR
13/02/2015	J/09	J 245	nd	nd	nd	nd	nd	+	NR

13/02/2015	J/09	J 246	nd	nd	nd	nd	nd	+	NR
13/02/2015	J/09	J 247	nd	nd	nd	nd	nd	nd	NR
13/02/2015	J/09	J 248	nd	nd	nd	nd	nd	nd	NR
13/02/2015	J/09	J 249	nd	nd	nd	nd	nd	+	NR
13/02/2015	J/09	J 250	nd	nd	nd	nd	nd	+	NR
13/02/2015	J/09	J 251	+	nd	nd	+	nd	nd	NR
13/02/2015	J/09	J 252*	nd	nd	nd	nd	+	nd	R
13/02/2015	J/09	J 253	nd	nd	nd	nd	nd	nd	NR
13/02/2015	J/09	J 254	nd	nd	nd	nd	nd	+	NR
13/02/2015	J/09	J 255	nd	nd	nd	nd	nd	nd	NR
13/02/2015	J/09	J 256	+	nd	nd	+	nd	nd	R
13/02/2015	J/09	J 257*	nd	nd	nd	nd	nd	nd	NR
13/02/2015	J/09	J 258	nd	nd	nd	nd	nd	nd	NR
13/02/2015	J/09	J 259	nd	nd	nd	nd	nd	nd	NR
13/02/2015	J/09	J 260	+	nd	nd	+	nd	nd	R
13/02/2015	J/09	J 261	nd	nd	nd	nd	nd	nd	NR
13/02/2015	J/09	J 262	nd	nd	nd	nd	nd	nd	NR
13/02/2015	J/09	J 263	nd	nd	nd	nd	nd	nd	NR
13/02/2015	J/09	J 264	nd	nd	nd	nd	nd	nd	NR
13/02/2015	J/09	J 265	nd	nd	nd	nd	nd	nd	NR
13/02/2015	J/09	J 266	nd	nd	nd	nd	nd	nd	NR
13/02/2015	J/09	J 267	+	nd	nd	+	nd	nd	R
05/03/2015	K/07	K 271*	+	nd	+	nd	nd	nd	R
05/03/2015	K/07	K 272*	nd	nd	nd	nd	nd	nd	NR
05/03/2015	K/07	K 273	nd	nd	nd	nd	nd	nd	NR
05/03/2015	K/07	K 274	+	nd	+	nd	nd	nd	R
05/03/2015	K/07	K 275	+	nd	+	nd	nd	nd	NR
05/03/2015	K/07	K 276	+	nd	+	nd	nd	nd	NR
05/03/2015	K/07	K 277	+	nd	+	nd	nd	nd	NR
05/03/2015	K/07	K 278	+	nd	+	nd	nd	nd	R

05/03/2015	K/07	K 279	+	nd	+	nd	nd	nd	R
05/03/2015	K/07	K 280	+	nd	+	nd	nd	nd	NR
05/03/2015	K/07	K 281	+	nd	+	nd	nd	nd	R
05/03/2015	K/07	K 282	nd	nd	nd	nd	nd	nd	NR
05/03/2015	K/07	K 283	+	nd	+	nd	nd	nd	R
05/03/2015	K/07	K 284	+	nd	+	nd	nd	nd	R
05/03/2015	K/07	K 285	+	nd	+	nd	nd	nd	R
05/03/2015	K/07	K 286	+	nd	+	nd	nd	nd	R
05/03/2015	K/07	K 287	+	nd	+	nd	nd	nd	NR
05/03/2015	K/07	K 288	+	nd	+	nd	nd	nd	NR
05/03/2015	K/07	K 289	+	nd	+	nd	nd	nd	NR
05/03/2015	K/07	K 290	nd	nd	nd	nd	nd	nd	NR
05/03/2015	K/07	K 291	nd	nd	nd	nd	nd	+	NR
05/03/2015	K/07	K 292	+	nd	+	nd	nd	nd	R
15/10/2015	L/14	L 298	nd	nd	nd	nd	nd	nd	NR
15/10/2015	L/14	L 299	+	+	nd	nd	nd	nd	R
15/10/2015	L/14	L 300	nd	nd	nd	nd	nd	nd	NR
15/10/2015	L/14	L 301	nd	nd	nd	nd	nd	nd	NR
15/10/2015	L/14	L 302	nd	nd	nd	nd	nd	nd	NR
15/10/2015	L/14	L 303	nd	nd	nd	nd	nd	nd	NR
15/10/2015	L/14	L 304*	nd	nd	nd	nd	nd	+	R
15/10/2015	L/14	L 305*	+	+	nd	nd	nd	nd	R
15/10/2015	L/14	L 306	nd	nd	nd	nd	nd	nd	NR
15/10/2015	L/14	L 307	nd	nd	nd	nd	nd	+	NR
15/10/2015	L/14	L 308	nd	nd	nd	nd	nd	nd	NR
15/10/2015	L/14	L 309	nd	nd	nd	nd	nd	nd	NR
15/10/2015	L/14	L 310	nd	nd	nd	nd	+	nd	R
15/10/2015	L/14	L 311	nd	nd	nd	nd	nd	+	NR
15/10/2015	L/14	L 312	+	+	nd	nd	nd	nd	R
15/10/2015	L/14	L 313	+	+	nd	nd	nd	nd	R

15/10/2015	L/14	L 314	nd	nd	nd	nd	+	nd	R
15/10/2015	L/14	L 315	nd	nd	nd	nd	nd	nd	NR
15/10/2015	L/14	L 316	+	+	nd	nd	nd	nd	R
15/10/2015	L/14	L 317	nd	nd	nd	nd	nd	nd	NR
15/10/2015	L/14	L 318	nd	nd	nd	nd	nd	nd	NR
15/10/2015	L/14	L 319	+	+	nd	nd	nd	nd	R
15/10/2015	L/14	L 320	nd	nd	nd	nd	nd	nd	NR
15/10/2015	L/14	L 321	nd	nd	nd	nd	nd	nd	NR
		Σ	85+8*	28	5	16	7	2	12

* Ave controle; + = positivo; nd= Não detectado; NR= Não realizado; R= Realizado

APÊNDICE D: Relação da análise histopatológica do intestino delgado dos frangos refugos positivos para AvRV e frangos controle, avaliadas no período de estudo e os resultados obtidos.

Condição	IEP ^a	Código	Idade	Porções do intestino delgado ^b																							
				P1							P2							P3									
				EV	PG	AF	FV	AE	AC	ILP	EV	PG	AF	FV	AE	AC	ILP	EV	PG	AF	FV	AE	AC	ILP			
Controle	ÓTIMO	A06	14	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-			
Controle	ÓTIMO	A18	14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-			
Controle	ÓTIMO	B38	7	++	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-			
Controle	ÓTIMO	B39	7	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-			
Controle	ÓTIMO	D104	14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-			
Controle	ÓTIMO	D105	14	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-			
Controle	REGULAR	E111	9	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
Controle	REGULAR	E112	9	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-			
Controle	REGULAR	F136	9	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-			
Controle	REGULAR	H190	14	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-			
Controle	REGULAR	H191	14	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
Controle	RUIM	I229	7	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
Controle	RUIM	I240	7	+	-	-	-	-	-	+	+	-	++	++	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-			
Controle	RUIM	J252	9	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
Controle	RUIM	L304	14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
PBV	ÓTIMO	A10	14	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+			
PBV	REGULAR	F156	9	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
PBV	REGULAR	H192	14	++	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	++			
PBV	REGULAR	H207	14	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+++	+	-	+	-	-	+			
PBV	REGULAR	H213	14	+++	-	-	++	-	-	++	+++	-	+	++	-	-	+	++	+	+	+	-	-	+			
PBV	RUIM	L310	14	+	-	-	+	-	-	+	++	+	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-			
PBV	RUIM	L314	14	-	-	-	-	-	-	-	++	++	-	-	-	-	+	++	-	-	+	-	-	++			

AvRV-A	ÓTIMO	D103	14	+	-	+	++	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-
AvRV-A	REGULAR	H203	14	++	-	-	++	-	+	+	+++	++	+	+	-	-	+	++	+	-	+	-	-	+
AvRV-A	REGULAR	H206	14	+++	++	-	++	-	-	++	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+
AvRV-A	REGULAR	H210	14	+++	++	+	+	-	+++	+	+	+	-	-	-	-	+	+++	++	-	+	-	-	+
AvRV-A	RUIM	L299	14	-	-	++	-	-	+	-	+++	-	++	+++	-	-	+	++	-	-	-	-	-	+
AvRV-A	RUIM	L312	14	-	-	+++	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	+	++	-	-	-	-	-	+
AvRV-A	RUIM	L313	14	+	-	++	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	++
AvRV-A	RUIM	L316	14	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	++	-	-	+	-	-	+
AvRV-A	RUIM	L319	14	-	-	+++	-	-	-	-	+++	-	+	+	+	++	+++	++	-	-	++	-	-	+
AvRV-D	ÓTIMO	A09	14	++	-	-	-	-	-	-	+++	++	-	++	-	++	+	++	+	-	++	-	+	+
AvRV-D	ÓTIMO	A23	14	+	-	++	-	+	+	-	+++	-	-	++	+	++	++	+	-	-	-	-	+	++
AvRV-D	RUIM	K274	7	-	-	-	-	-	-	+	+++	++	++	++	+	+++	++	++	-	-	-	+	++	+
AvRV-D	RUIM	K278	7	+	++	-	-	-	-	-	++	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
AvRV-D	RUIM	K279	7								-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AvRV-D	RUIM	K281	7	+	-	-	-	-	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
AvRV-D	RUIM	K283	7	+	-	-	-	+	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AvRV-D	RUIM	K285	7						+++		+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
AvRV-D	RUIM	K292	7	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AvRV-F	ÓTIMO	A05	14	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+++	-	-	-	+
AvRV-F	ÓTIMO	A07	14	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-
AvRV-F	ÓTIMO	A20	14	+	-	++	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	++	+
AvRV-F	ÓTIMO	C63	7	+	-	+	+	-	-	+	++	-	-	-	+	++	+	+	+++	+++	+	-	++	++
AvRV-F	ÓTIMO	C67	7	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	++	+++	-	-	+	+
AvRV-F	REGULAR	F143	9	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	++	-	-	-	-
AvRV-F	REGULAR	F157	9	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
AvRV-F	REGULAR	G166	9	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	++	-	-	-	-	-	++	-
AvRV-F	REGULAR	G169	9	++	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+
AvRV-F	REGULAR	G170	9	++	-	-	-	-	-	+	++	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-

AvRV-F	REGULAR	G172	9	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	
AvRV-F	REGULAR	G176	9	+	++	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	
AvRV-F	REGULAR	G180	9	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	
AvRV-F	RUIM	I236	7	-	-	-	-	-	-	-	++	++	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-
AvRV-F	RUIM	J260	9	-	-	-	-	-	-	-	++	++	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-

^a Índice de Eficiência Produtiva; ^b Porções intestino delgado: P1= duodeno medial; P2= jejuno-medial; P3= jejuno adjacente ao vestígio do saco vitelínico.

Alterações histopatológicas: Espessamento de Vilo (EV); Presença de Granulócitos (PG); Atrofia de Vilo (AV); Fusão de vilo (FV); Apoptose de enterócitos (AE); Abscesso de cripta (AC); Infiltrado de lâmina própria (ILP)

(-) = sem alterações; (+) = alterações leves; (++) = alterações moderadas; (+++) alterações acentuadas.

APÊNDICE E: Relação das amostras de cama de aviário dos lotes avaliadas no período de estudo e os resultados obtidos.

Data coleta	IEP	Lote/idade (dias)	Código amostra	Resultado EGPA	
13/02/2015	ÓTIMO	A/14	A 25	ND	
13/02/2015		A/14	A 26	ND	
13/02/2015		A/14	A 27	ND	
27/02/2015		B/08	B 52	ND	
27/02/2015		B/08	B 53	ND	
27/02/2015		B/08	B 54	ND	
27/02/2015		C/08	C 79	ND	
27/02/2015		C/08	C 80	ND	
27/02/2015		C/08	C 81	ND	
15/10/2015		D/13	D 106	ND	
15/10/2015		D/13	D 107	ND	
15/10/2015		D/13	D 108	ND	
26/02/2015		REGULAR	E/09	E 133	ND
26/02/2015	E/09		E 134	ND	
26/02/2015	E/09		E 135	ND	
02/03/2015	F/09		F 160	ND	
02/03/2015	F/09		F 161	ND	
02/03/2015	F/09		F 162	ND	
02/03/2015	G/09		G 187	AvRV F	
02/03/2015	G/09		G 188	ND	
02/03/2015	G/09		G 189	AvRV F	
15/10/2015	H/14		H 214	ND	
15/10/2015	H/14		H 215	ND	
15/10/2015	H/14		H 216	ND	
13/02/2015	RUIM		I/08	I 241	AvRV F
13/02/2015			I/08	I 242	ND
13/02/2015			I/08	I 243	ND
13/02/2015		J/09	J 268	ND	
13/02/2015		J/09	J 269	ND	
13/02/2015		J/09	J 270	ND	
05/03/2015		K/07	K 295	Inconclusivo	
05/03/2015		K/07	K 296	ND	
05/03/2015		K/07	K 297	AvRV A	
15/10/2015		L/14	L 322	ND	
15/10/2015		L/14	L 323	ND	
15/10/2015		L/14	L 324	ND	

ND= Não detectado