PUBVET, Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia.

Aspectos epidemiológicos e laboratoriais da laringotraqueíte infecciosa das aves

Carolina de Alvarenga Cruz¹, Fernanda Cassioli de Moraes¹, Elisa Batistella Chrispim², Daniel Bartoli de Sousa³, Raphaella Barbosa Meirelles-Bartoli³

¹ Alunas do Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Campus Jaboticabal.

² Médica Veterinária autônoma.

³ Docentes do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Goiás (UFG), Campus Jataí, Unidade Jatobá, Laboratório de Sanidade Animal.

Resumo

A laringotraqueíte infecciosa das aves (LTI) é uma doença respiratória causada por um herpesvírus da família Herpesviridae. Trata-se, principalmente, de uma doença das aves domésticas, embora também possa afetar faisões, perdizes e pavões. Os sinais clínicos e lesões patológicas podem variar de extremamente grave, como alguns pássaros que morrem devido a asfixia, a muito leve, indistinguíveis a partir de outras doenças respiratórias leves de galinhas. A lesão principal é traqueíte. Em aves infectadas o vírus pode tornar-se latente e re-excretado em uma data posterior, sem sinais clínicos. O diagnóstico laboratorial depende de isolamento de vírus, demonstração da presença do vírus ou de antígenos virais, e detecção de anticorpos específicos no soro. O

exame histopatológico pode ser importante na detecção de inclusões intranucleares característicos na traquéia.

Palavras-chave: Laringotraqueíte infecciosa (LTI), vírus da Laringotraqueíte infecciosa (VLTi), herpesvírus.

Epidemiological and laboratorial aspects of avian infectious laryngotracheitis

Abstract

Avian infectious laryngotracheitis (ILT) is a respiratory disease caused a herpesvirus, family Herpesviridae. It is principally a disease of chickens, although it can also affect pheasants, partridges and peafowl. The clinical signs and pathological reactions may vary from extremely severe, with some birds dying due to asphyxiation, to very mild, indistinguishable from other mild respiratory diseases of chickens. The principal lesion is tracheitis. In infected birds the virus can become latent and re-excreted at a later date without clinical signs. Laboratory diagnosis depends on isolation of the virus, demonstration of the presence of the virus or viral antigens, and detection of specific antibodies in the serum. Histopathological examination of the trachea for characteristic intranuclear inclusions may be of value.

Keywords: Infectious laryngotracheitis (ILT), infectious laryngotracheitis virus (ILTV), herpesvirus.

1. INTRODUÇÃO

As doenças respiratórias compreendem o principal problema sanitário em granjas avícolas, levando à condenação de um grande número de carcaças, além de perdas na produtividade. O sistema de criação moderno, baseado em alta densidade, contribui para a deterioração da qualidade do ar, aumentando os riscos da ocorrência de enfermidades e tornando seu controle um novo desafio. Dentre estes problemas, o vírus da laringotraqueíte infecciosa (VLTi)

tem adquirido grande importância nos últimos anos, devido a surtos da doença clínica, como em Bastos (SP) em 2002 (PORTZ, 2008).

A laringotraqueíte infecciosa (LTI) é uma doença viral aguda do trato respiratório das galinhas que pode causar grandes perdas econômicas devido à alta mortalidade e diminuição da produção de ovos. A doença tem distribuição mundial, embora seja bem controlada em áreas de produção intensiva, onde podem ocorrer surtos esporádicos. É uma doença pertencente à lista da Organização Internacional de Epizootias (OIE) e, portanto, deve ser notificada ao serviço oficial de defesa sanitária animal local, além de fazer parte das doenças que devem ser controladas em plantéis livres de patógenos específicos (GAMA; CANAL, 2009).

O agente etiológico é um herpesvírus, da mesma subfamília do vírus da doença de Marek. O vírus é encontrado quase que exclusivamente no trato respiratório. Sua transmissão é exclusivamente horizontal e não existem evidências de que seja transmissível para o ser humano ou outros mamíferos (GAMA; CANAL, 2009). Uma característica das infecções por herpesvirus é a capacidade deste permanecer no hospedeiro infectado após a infecção aguda em um estado de latência, tornando-os importantes fontes de infecção (VILLANUEVA, 2005).

Formas graves da doença são caracterizadas por sinais de depressão respiratória, ofegação, expectoração de muco sanguinolento, e elevada mortalidade. Nas indústrias são encontradas formas mais leves de infecção e manifestam sinais variados como traqueíte mucóide, sinusite, conjuntivite; e possui baixa mortalidade (RODRÍGUEZ-AVILA et al., 2008).

2. HISTÓRICO

Esta enfermidade foi descrita pela primeira vez em 1925 nos EUA, embora alguns relatos indiquem que a doença já existia antes. Inicialmente foi denominada de bronquite infecciosa e broncopneumonia, sendo que, o termo laringotraqueíte foi sugerido em meados de 1930 e sofreu nova alteração para LTI em 1931, pelo Comitê Especial de Doenças de Aves da Associação Médica

Veterinária Americana. O agente foi caracterizado como um vírus por Beaudette em 1937, após a demonstração de que a filtração não eliminava o agente. A LTI foi a primeira doença viral importante de galinhas para a qual foi desenvolvida uma vacina eficiente (GAMA; CANAL, 2009).

No Brasil, na década de 1970, o VLTÍ foi isolado pela primeira vez por Hipólito et al., de galinhas com doença respiratória que também estavam infectadas com o vírus da doença de Newcastle. Em 1980, foi novamente isolado e caracterizado como de baixa patogenicidade para pintos de linhagem de corte e, posteriormente, denominado estirpe LT 1543. No Rio de Janeiro, foi descrita a primeira epidemia severa, entre 1981 e 1982, em poedeiras comerciais de 10 meses de idade, que apresentaram queda de 6% de produção e mortalidade de 5,5%. Vargas (1995) detectou anticorpos contra VLTÍ em plantéis do Rio Grande do Sul (RS), embora não tenha encontrado sinais da doença aguda nem tampouco tenha conseguido isolar o vírus (GAMA; CANAL, 2009).

A partir de 2001, foi identificada a forma silenciosa da LTI no Estado da Geórgia/EUA, cuja frequência vem aumentando continuamente (PORTZ, 2008).

No Brasil, de 2002 a 2003, ocorreu um surto de LTI em aves de postura no estado de São Paulo, levando à alta mortalidade entre os lotes afetados. O vírus foi identificado por meio de inoculação em ovos embrionados de galinhas e pela reação em cadeia pela polimerase (PCR) (BRANDÃO; CHACÓN, 2009).

Em 2007, em Minas Gerais, foram encontrados 27,4% de positividade em 712 amostras de soro oriundas de poedeiras comerciais e matrizes, sugerindo que existe a presença do VLTÍ neste Estado e também reforçando a possibilidade da presença da forma subclínica da doença (GAMA; CANAL, 2009).

3. ETIOLOGIA

3.1. Classificação, morfologia e composição

O vírus da LTI é classificado como membro do gênero *Iltovirus* dentro da família *Herpesviridae* e subfamília *Alphaherpesvirinae*. O vírus foi mostrado

geneticamente diferente de outros alfaherpesvírus baseado na análise da sequência de DNA, e estes achados levaram à sua recente classificação de único membro do gênero *Iltovirus*. O vírus é taxonomicamente identificado como Gallid herpesvirus I (RODRÍGUEZ-AVILA et al., 2008).

A família *Herpesviridae* congrega um grande número de vírus que tem como característica comum sua arquitetura contendo um nucleocapsídeo icosaédrico com uma molécula de DNA de fita dupla, circundado por uma substância amorfa (tegumento) e por um envelope glicoprotéico. Os virions variam de esféricos a pleomórficos, medindo entre 120 a 200nm de diâmetro. O núcleo capsídico é exagonal e tem um diâmetro de 80 a 100nm. Os *Alphaherpesvirinae* têm como principal propriedade o estabelecimento de latência em neurônios dos gânglios sensoriais após infecção aguda. Esta capacidade de estabelecer e, posteriormente, reativar infecções latentes desempenham um papel fundamental na perpetuação desses vírus na natureza (GAMA; CANAL, 2009).

O genoma viral consiste em um DNA de fita dupla linear contido no interior do core viral, com 155kb, sendo 120kb referente à região longa única, 17kb referentes à região curta única e duas repetições de 9kb de uma sequência denominada sequência repetida invertida flanqueando a região curta única (BRANDÃO; CHACÓN, 2009).

Os 155kb do genoma do DNA do VLTII foram quase completamente sequenciados durante a última década. Uma vez que estes estudos revelaram que a estrutura do genoma e o arranjo do gene VLTII são amplamente similares àqueles encontrados em alfaherpesvírus de mamíferos, tais como o vírus do herpes simplex (HSV-1) e o do pseudorabies vírus (PrV), o conhecimento acerca das funções dos genes destes vírus pode ser utilizado para o desenvolvimento de vacinas geneticamente modificadas de VLTII (LUSCHOW et al., 2001).

Recentemente, encontrou-se uma inversão dentro da região longa única do genoma do VLTII que também havia sido identificada no genoma do *Psittacid herpesvirus I* (PshV-1), causador da doença de Pacheco. A presença

de genes específicos para o Gallid herpesvirus I (GaHV-1) e PsHV-1 podem indicar um ramo separado dentro da árvore filogenética dos herpesvirus. A partir desses estudos recentes, o genoma do PsHV-1 poderá ser agrupado dentro do gênero *Iltovirus*, juntamente com o VLT1 (PORTZ, 2008).

As glicoproteínas são os constituintes virais responsáveis pela estimulação da resposta imune humoral e celular, sendo importantes na interação vírus-hospedeiro. York et al. (1990) descreveram que os principais compostos imunogênicos do vírus são as glicoproteínas B (gB), C (gC), D (gD), X (gX) e K (gK). Estudos funcionais das glicoproteínas dos herpesvirus revelaram que as gB, gD, gH e gK são essenciais para a replicação viral, enquanto que gC, gE, gG, gI, gJ, não são essenciais, mas estão envolvidos em importantes funções virais, como o reconhecimento das células alvo e na virulência (VILLANUEVA, 2005).

A glicoproteína B é necessária para a infectividade do herpesvírus e está envolvida com a penetração na célula do hospedeiro. Além disso, a gB provoca anticorpos neutralizantes, mediada por resposta imune celular, e tem demonstrado ser uma candidata para vacinas de subunidade como antígeno recombinante (POULSENT, 1997).

Dentre as glicoproteínas não essenciais, a deleção dos genes das gC, gG, gM ou gN não impediu a invasão em neurônios e a disseminação transneuronal. Contudo, a ausência da gE diminuiu a transferência transneuronal, em particular no parassimpático e no gânglio trigêmio (VILLANUEVA, 2005).

A Glicoproteína G (gG) desempenha vários papéis importantes para os alphaherpesvirus. Ela se liga a um vasto leque de quimiocinas para inibir sua atividade biológica. Vírions livres se ligam aos receptores específicos na superfície da célula, resultando na fusão do envelope do vírus com a membrana celular. Além disso, a gG participa do curso para a propagação do vírus diretamente de uma célula infectada para as adjacentes, aderindo às células não infectadas (ZHAOGANG; MANFU, 2005).

3.2. Replicação viral

O ciclo de replicação do VLTÍ parece ser semelhante à de outros alphaherpesvírus, como o HSV-1 (RACHAMADUGO et al, 2009). A infecção inicia pela ligação aos receptores das células alvo, seguido da fusão do envelope com a membrana citoplasmática (GAMA; CANAL, 2009). O nucleocapsídeo viral penetra no citoplasma celular e é transportado ao núcleo por microtúbulos celulares (PORTZ, 2008).

O DNA viral chega ao núcleo da célula hospedeira por meio de poros nucleares onde ocorre a replicação do genoma e a montagem dos nucleocapsídeos. Os novos nucleocapsídeos formados migram da membrana nuclear e se acumulam em vacúolos no retículo endoplasmático do citoplasma, onde adquirem o envelope. As partículas envelopadas, por sua vez, saem da célula hospedeira por lise, ou por fusão da membrana e exocitose. No entanto, dentre os poucos vírions completos, várias partículas sem nucleocapsídeo são formadas. Provavelmente, estes erros estruturais são em parte responsáveis pelos baixos títulos do VLTÍ encontrados nas culturas de células (PORTZ, 2008).

3.3. Susceptibilidade a agentes físicos e químicos

As partículas virais são inativadas por agentes lipolíticos, como clorofórmio, éter e detergentes que solubilizam seu envelope. Os vírions também são sensíveis a desinfetantes comuns, incluindo fenol a 5%, cresol 3% e, em menos de um minuto, são inativados pela formalina, hipoclorito e iodoform. Os dados disponíveis da estabilidade do vírus ao calor variam consideravelmente (GAMA; CANAL, 2009).

O VLTÍ é inativado quando exposto a 55°C por 15 minutos ou 38°C por 48 horas, embora outro trabalho indique que após uma hora a 56°C, ainda pode-se detectar vírus viáveis. No exsudato traqueal e na carcaça, o vírus pode se manter viável por um período de 10 a 100 dias em temperaturas entre 13 e 23°C, no entanto, outro trabalho indica que a infectividade foi eliminada das carcaças em menos de 44 horas a 37°C. Já a manutenção da viabilidade

viral pode ser mantida por vários meses a 4°C em pH próximo do neutro e quando mantido em diluentes adequados, como meio de cultivo e glicerol. Em laboratórios de pesquisa, pode ser estocado por vários anos a -70°C ou liofilizado (GAMA; CANAL, 2009).

3.4. Classificação de cepas

As cepas do vírus da LTI parecem ser antigenicamente homogêneas baseadas em vírus-neutralização, ensaios de imunofluorescência e testes de proteção cruzada. Entretanto, uma pequena variação antigênica entre as cepas foi sugerida, pelos achados em testes de neutralização, de que algumas cepas são neutralizadas por anticorpos heterólogos (RODRÍGUEZ-AVILA et al., 2008).

Algumas amostras mais patogênicas do VLTi, ao sofrerem passagens sequenciais em ovos embrionados de galinha ou cultivo celular, tendem a atenuar a virulência, embora ela possa ser revertida após algumas passagens por aves suscetíveis. Diferenciação de cepas de diferentes patogenidades, particularmente as do tipo de campo e as cepas vacinais são um importante problema prático. A avaliação dos padrões de mortalidade nos ovos embrionados propôs um sistema biológico para diferenciar as cepas de VLTi , uma vez que os padrões de mortalidade estão intimamente relacionados com a virulência (RODRÍGUEZ-AVILA et al., 2008).

4. IMPORTÂNCIA DA ENFERMIDADE PARA A AVICULTURA NACIONAL

A significância econômica da LTI não foi precisamente determinada. Entretanto, a indústria de aves domésticas dos Estados Unidos perde muitos dólares a cada ano em consequência da mortalidade induzida do VLTi e da queda na produção de ovos. Em outros países, pode-se observar perdas similares na produção intensiva de indústrias de produtos avícolas (RODRÍGUEZ-AVILA et al., 2008).

A importância econômica e social da avicultura brasileira coloca o setor em evidência no âmbito internacional devido à mão de obra cada vez mais qualificada e altos índices de produção interna e exportação (PORTZ, 2008).

Os prejuízos com as galinhas poedeiras ocorrem nos lotes de início de produção, onde se observa alta refugagem, ausência de pico de produção e mortalidade (PORTZ, 2008).

5. EPIDEMIOLOGIA

5.1. Distribuição e ocorrência

A doença é de distribuição geográfica cosmopolita e de ocorrência cíclica em áreas endêmicas, principalmente em áreas de alta densidade de produção. Nas áreas onde a produção avícola é realizada em larga escala, existe a expectativa de uma maior prevalência e persistência do VLTi. A doença clássica já foi descrita em diversos países de vários continentes, inclusive no Americano. Sua ocorrência já foi demonstrada em diversas partes dos Estados Unidos, Holanda, França, Alemanha, Austrália, Inglaterra, Suécia, Hungria, Polônia, África do Sul, Índia e União Soviética (GAMA; CANAL, 2009).

5.2. Morbidade e mortalidade

Biologicamente, as cepas do VLTi podem ser de alta virulência, causando alta morbidade e mortalidade, e cepas de baixa virulência, a qual produz infecção suave ou inaparente (BRANDÃO; CHACÓN, 2009).

Formas severas da doença causam alta morbidade (90 a 100%) e variada mortalidade; a mortalidade pode variar de 5 a 70% mas o normal é na faixa de 10 a 20%. Formas brandas da doença descritas na Grã Bretanha, Austrália, Estados Unidos e Nova Zelândia resultaram em morbidade em torno de 5% e mortalidade muito baixa (RODRÍGUEZ-AVILA et al., 2008).

5.3 Transmissão

O VLTi é altamente específico para galinhas, faisões e perdizes, não sendo descrita a transmissão entre as espécies. Perus jovens foram infectados experimentalmente com três amostras de vírus, no entanto, apenas duas demonstraram ser patogênicas e produziram lesões no trato respiratório

superior. Em patos, a infecção experimental produziu a doença subclínica e soroconversão (GAMA; CANAL, 2009). Ovos embrionados de pombo e galinha de angola não se mostraram susceptíveis à infecção.

O vírus é eliminado do organismo das aves doentes ou portadoras pelas secreções oro-nasais, podendo alcançar aves saudáveis ou susceptíveis pelo ar, equipamentos, esterco, cama e trânsito de veículos e funcionários. As portas de entrada naturais do VLTÍ são o trato respiratório superior e a via ocular, mas também pode ocorrer pela ingestão viral (GAMA; CANAL, 2009).

A principal forma de transmissão do VLTÍ ocorre pelo contato direto ave a ave, sendo que se dissemina mais rapidamente de animais com a infecção aguda do que daqueles clinicamente recuperados. O vírus pode ser transmitido também por aerossóis, pelos equipamentos, água e pelo lixo contaminado. A transmissão via ovo ainda não foi demonstrada (GAMA; CANAL, 2009). No surto da região de Bastos-SP, a disseminação ocorreu de forma rápida entre galinhas de um mesmo galpão e galpões com aves do mesmo lote (PORTZ, 2008).

5.4. Resistência à doença

Não está bem estabelecida a susceptibilidade ligada à idade, linhagem genética ou sexo, mas existem evidências que indicam que, em galinhas de postura, linhagens pesadas são mais susceptíveis do que as leves e, nas pesadas, os machos parecem ser mais susceptíveis do que as fêmeas (GAMA; CANAL, 2009).

A susceptibilidade parece diminuir com a progressão da idade e a doença é mais severa no verão, principalmente em temperaturas superiores a 35°C. A idade de maior susceptibilidade seria por volta da 10ª semana e na época de início de produção, entretanto, existem evidências de que galinhas adultas manifestam sinais clínicos mais característicos (GAMA; CANAL, 2009).

In vitro, os linfócitos da bolsa de Fabricius, do baço, do timo e do sangue periférico são resistentes à infecção com VLTÍ, enquanto que os macrófagos de galinhas dos mesmos locais são susceptíveis (LOUDOVARIS et al., 1991).

Uma variedade de mecanismos específicos e não específicos são utilizados pelos animais em sua defesa contra patógenos. Os mecanismos não-específicos incluem a ação dos macrófagos, complemento, lisozima, e o pH dos fluidos corporais, enquanto os mecanismos específicos são o resultado do sistema imunológico respondendo à infecção. Um dos elementos-chave na regulação genética da resposta imune é o complexo principal de histocompatibilidade do frango, o que tem claramente demonstrado a influência na resistência de diferentes animais a uma variedade de vírus (LOUDOVARIS et al., 1991).

6. PATOGENIA

Após a entrada do vírus, segue-se a fase de intensa replicação viral nos seios nasais, traquéia e pulmões, por meio da aderência na membrana das células receptoras. Não existe evidência de que exista uma fase de viremia. Galinhas portadoras podem frequentemente, eliminar o vírus e esta disseminação pode variar e aumentar de intensidade nos momentos de estresse, como: início de postura, alta lotação, excesso de calor e frio, mudança de alimentação, presença de ruídos, alta concentração de amônia, transporte e nos momentos de tratamento ou vacinação do lote (GAMA; CANAL, 2009).

O vírus multiplica-se principalmente no epitélio da laringe e traquéia, assim como em outras membranas e tecidos como o conjuntivo, seios nasais, sacos aéreos e pulmões. O vírus está presente nos tecidos da traquéia e na secreção traqueal por seis a oito dias após a incubação (BRANDÃO; CHACÓN, 2009).

Após replicação na mucosa da traquéia, o VLTi invade os terminais nervosos e é transportado através do fluxo axônico retrógrado ao gânglio trigêmeo (GAMA; CANAL, 2009). O vírus pode ser encontrado de quatro a sete dias depois da infecção no gânglio trigêmeo e pode permanecer ali por até quinze meses (VILLANUEVA, 2005).

O processo de latência ocorre pela integração do DNA genômico viral ao DNA da célula hospedeira ou pela manutenção do DNA viral sob forma circular no núcleo das células, de modo extracromossômico. Isso acontece tanto em amostras de campo como em amostras vacinais do vírus e tem uma óbvia implicância na debelação do vírus no animal infectado e no controle da doença sobre a população aviária (BRANDÃO; CHACÓN, 2009).

Uma vez latente, o vírus não é apresentado ao sistema imune porque não há expressão de suas proteínas, o que impede tanto a ação do sistema imune na defesa do animal afetado, como a detecção da resposta imune por testes sorológicos. Com isso, a fonte de infecção não é detectada, não sendo excluída do lote, podendo vir a transmitir o VLTi para aves susceptíveis de modo esporádico ao longo da vida da ave (BRANDÃO; CHACÓN, 2009).

7. SINAIS CLÍNICOS

Os sinais clínicos, na infecção natural, aparecem de seis a doze dias após a entrada do vírus no organismo da ave. Na inoculação experimental via intratraqueal teve resultados de período de incubação de 2 a 4 dias (RODRÍGUEZ-AVILA et al., 2008).

A manifestação clínica pode variar desde uma infecção grave a formas menos severas (GAMA; CANAL, 2009). A infecção pelo VLTi causa doença aguda do trato respiratório superior e o vírus pode estabelecer latência no sistema nervoso central. O VLTi é o único herpesvírus que causa doença respiratória grave com grande formação de muco na traquéia, seguido frequentemente de hemorragia (RACHAMADUGU et al, 2009).

A forma aguda da doença nas aves, que é a forma propriamente descrita, é caracterizada por dispnéia severa, tosse e expectoração de exsudato muco-sanguinolento, em casos mais severos, a morte, pode ocorrer de dois a três dias. Pode-se encontrar exsudato muco-sanguinolento nas penas das aves, nas paredes e no piso do galpão. (GAMA; CANAL, 2009).

O período de incubação é maior do que o período em que o animal infectado dissemina o vírus, isto é, quando os sinais clínicos cessam, o período

de eliminação do vírus já terminou. O curso da doença varia de acordo com a severidade das lesões, sendo que, geralmente, a maioria das aves recupera-se de dez a quatorze dias (GAMA; CANAL, 2009).

A doença pode apresentar-se de forma branda e, muitas vezes, passar despercebida. As aves apresentam sonolência, conjuntivite, sinusite, traqueíte, lacrimejamento, descarga nasal, inchaço do seio infraorbital, estertores, retardo de crescimento e queda variável na produção de ovos. Nesses casos, são poucas as aves que possuem lesões características, possibilitando que a LTI seja confundida com outras doenças respiratórias. A forma suave, também denominada LTI silenciosa, tem sido comumente observada em áreas de intensa produção avícola, em lotes de galinhas de postura comercial, reprodutoras e em frangos de corte de vários países (GAMA; CANAL, 2009).

O estado de portador é caracterizado por períodos de latência intercalados com curtos, intermitentes e espontâneos episódios de disseminação do vírus. Bagust (1986) demonstrou que as infecções latentes podem ser estabelecidas na ausência de sinais clínicos observáveis e com baixas concentrações de vírus (VILLANUEVA, 2005).

8. PATOLOGIA

8.1. Lesões macroscópicas

As lesões macroscópicas podem ser encontradas na conjuntiva e em toda a extensão do trato respiratório das aves infectadas com o VLTi (GAMA; CANAL, 2009).

Na necropsia, as lesões mais importantes encontram-se na laringe e traquéia, onde se espera encontrar um processo inflamatório que pode variar de mucoso a hemorrágico. Na traquéia, são encontradas lesões diftéricas com membranas mucosas hemorrágicas e tecido necrótico ao longo da mesma, podendo os sinais da inflamação ser encontrados até os brônquios, pulmões e sacos aéreos (BRANDÃO; CHACÓN, 2009).

Um achado comum em galinhas acometidas pelo VLTÍ de alta virulência é o tampão de cáseo que se forma na luz traqueal. Isto impede a respiração normal da ave, fazendo-a esticar o pescoço para respirar, um sinal clínico importante nesta doença (VILLANUEVA, 2005).

Nas formas leves da LTI, edema, congestão e/ou inflamação do epitélio da conjuntiva e seios infraorbitais e uma traqueíte mucóide podem ser as únicas alterações macroscópicas detectáveis (GAMA; CANAL, 2009).

8.2. Lesões microscópicas

As alterações microscópicas variam com o estágio em que a doença se encontra. Primeiramente, as alterações na mucosa da traqueia incluem perda da conformação celular e infiltração de células inflamatórias. Com o progresso da infecção viral, ocorre perda dos cílios, dilatação das células epiteliais, e a traqueia se torna edematosa (RODRÍGUEZ-AVILA et al., 2008).

Células multinucleadas são formadas e linfócitos, histiócitos, e células plasmáticas migram até a mucosa e submucosa depois de dois a três dias. Depois, a lise celular e descamação resultam em uma superfície mucosa igualmente coberta por uma fina camada de células basais ou ausência de qualquer recobrimento epitelial. Capilares sanguíneos da lâmina própria podem sobressair para dentro do lúmen da traquéia. A hemorragia pode ocorrer em casos de severa destruição epitelial e descamação com exposição e ruptura destes capilares (RODRÍGUEZ-AVILA et al., 2008).

Corpúsculos de inclusão intranucleares podem ser visíveis entre o primeiro e o quinto dias pós-infecção, desaparecendo em função da descamação epitelial. É sabido que, apesar de o VLTÍ não ser neurovirulento, ele é capaz de se estabelecer de forma latente nos gânglios trigêmeos de galinhas (BRANDÃO; CHACÓN, 2009).

9. DIAGNÓSTICO

Em geral, o diagnóstico da LTI requer assistência laboratorial, pois os outros patógenos respiratórios de aves comerciais podem causar sinais clínicos e lesões semelhantes. Somente em casos de doença aguda severa com alta mortalidade e expectoração de sangue é que o diagnóstico pode ser feito apenas nos sinais clínicos (RODRÍGUEZ-AVILA et al., 2008).

De outra maneira, o diagnóstico da LTI deve ser baseado em um ou mais diagnósticos confirmatórios laboratoriais incluindo procedimentos de detecção de corpúsculos de inclusão intranucleares, isolamento do vírus, detecção do vírus em tecido traqueal ou muco respiratório, detecção de antígenos do vírus, ou sorologia (RODRÍGUEZ-AVILA et al., 2008).

9.1. Histopatológico

A histopatologia continua sendo utilizada como método rápido de diagnóstico, e é baseada na observação de sincícios no epitélio traqueal, com corpúsculos de inclusão intranuclear (CI), necrose e hemorragia. Os CI podem ser observados nos primeiros cinco dias da infecção, mas desaparecem com a evolução do quadro, como resultado da necrose e descamação das células epiteliais (VILLANUEVA, 2005).

O VLTi produz corpúsculos de inclusão intranuclear nas células epiteliais respiratórias e nas células da conjuntiva, e podem ser detectados por coloração com Giemsa ou Hematoxilina-eosina (BRANDÃO; CHACÓN, 2009).

9.2. Isolamento viral e cultivo celular

O isolamento viral pode ser feito por meio da inoculação de suspensões virais de exudato respiratório e conjuntival, raspados de traqueia ou tecidos, na membrana córioalantóide (MCA) de ovos embrionados SPF de nove a dez dias de incubação. Após dois a cinco dias, há produção de placas opacas de MCA ou morte embrionária (PORTZ, 2008).

Os cultivos celulares primários atualmente utilizados para a propagação do VLTi incluem células do fígado de embrião (CEL), células do rim de embrião (CK), células de fibroblasto de embrião (CEF), células de pulmão de embrião (CEL) e células de linhagem como a célula de rim de macaco verde africano (VERO) (PORTZ, 2008). A comparação dos títulos virais obtidos destes diferentes sistemas indica que as células do fígado de embrião produzem os maiores títulos virais (VILLANUEVA, 2005).

Embora o VLTi venha sendo replicado preferencialmente, em cultivos primários CK e CEL, as cepas de VLTi pouco patogênicas ou LTI silenciosa não foram capazes de causar efeito citopático nestes respectivos cultivos nem mesmo em várias células de linhagem, após passagens consecutivas (PORTZ, 2008).

O VLTi foi inicialmente propagado na MCA de desenvolvimento de embriões de galinha. Com o advento da cultura de células, os pesquisadores estabeleceram rapidamente que o vírus iria replicar em células de rim de galinha adulta, bem como em uma variedade de células epiteliais de embrião de galinha, tais como rim, fígado e pulmão (SCHNITZLEIN; RADZEVICIUS; TRIPATHY, 1992).

Embora as culturas de células primárias ainda sejam usadas como hospedeiras de VLTi, não podem ser mantidas *in vitro*. Assim, um suprimento contínuo de células recém-colhidas é necessário, o que resulta em um grau de variabilidade inerente. Além disso, essas culturas são invariavelmente contaminadas com células fibroblásticas, que não podem ser produtivamente infectadas pelo VLTi (SCHNITZLEIN; RADZEVICIUS; TRIPATHY, 1992).

9.3. Sorologia

Existem várias técnicas desenvolvidas para a detecção de anticorpos contra o VLTi: imunodifusão em ágar gel (IDGA), vírus-neutralização (VN), reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e ensaio imunoenzimático (ELISA) (BRANDÃO; CHACÓN, 2009).

O teste de ELISA é utilizado para estudos epidemiológicos e monitoramento dos plantéis, além de detectar infecções sub-clínicas do vírus, já que é um teste rápido e sensível para detecção de anticorpos contra VLTi (GAMA; CANAL, 2009). Esta técnica também tem sido utilizada para a detecção de proteínas virais em exudatos de traqueia (PORTZ, 2008) e são os testes utilizados como prova de triagem por serem práticos, rápidos, de fácil aplicação e necessitarem de pouca quantidade de soro e antígeno (VILLANUEVA, 2005).

A comparação direta dos testes de RIFI, soroneutralização e ELISA demonstram que todos os sistemas são válidos para detecção e quantificação de anticorpos para VLTi, embora o ELISA tenha demonstrado possuir maior sensibilidade do que os outros testes (GAMA; CANAL, 2009).

Dentre as técnicas que detectam o antígeno viral encontram-se a IDGA, que apresenta baixa sensibilidade analítica; a RIFI com anticorpos policlonais, que é utilizada para a detecção do antígeno viral em amostras de traqueia e conjuntiva entre o sexto e o oitavo dia PI, e embora seja uma prova rápida, tem a desvantagem de apresentar muitas reações inespecíficas. A técnica de imunoperoxidase (IP), com anticorpos monoclonais mostra-se mais simples, rápida e sensível que a RIFI, além de preservar a estrutura histológica, porém com baixa especificidade (VILLANUEVA, 2005).

9.4. Métodos moleculares

Há procedimentos para a detecção do DNA do VLTi usando ensaios de hibridação e imunotransferência pontual e fragmentos de DNA clonados e marcados com digoxigenina. Esses procedimentos demonstraram ser altamente sensíveis na etapa aguda e em etapas de convalescência de aves (BRANDÃO; CHACÓN, 2009). No entanto, a extração e purificação de DNA são necessárias, tornando a técnica trabalhosa (VILLANUEVA, 2005).

As deficiências das técnicas anteriormente citadas incluindo demora na obtenção de resultados ou falta de especificidade, despertou interesse no

desenvolvimento de técnicas de detecção mais rápidas e específicas como a reação em cadeia da polimerase (PCR) (VILLANUEVA, 2005).

A utilização de métodos de amplificação de DNA nos últimos anos revelou-se eficaz na investigação da epidemiologia dos casos de domínio do VLT. Estes métodos incluem a detecção de cepas de campo usando a PCR juntamente com sondas não radioativas. Diferenciação entre isolados de campo de alta virulência e baixa também tem sido eficaz pelo uso de PCR, RFLP e análise da sequência (CREELAN et al., 2006).

Em contraste ao aparelho de PCR caro de processo complicado, a amplificação isotérmica loop-mediada (LAMP) fornece um método simples, com despesas razoáveis e uma reação em tempo eficaz, com conclusão em uma hora. Grandes quantidades de produtos amplificados da reação LAMP permite a detecção eficaz de DNA viral, por julgamento visual da turbidez ou mudança de cor com a adição de SYBR Green I. Sendo assim, esse método será um complemento poderoso para o controle de surtos de VLT em granjas avícolas (CREELAN et al., 2006).

9.5. Diagnóstico diferencial

Doença respiratória associada com LTI deve ser distinguida de outros patógenos respiratórios de aves domésticas que podem causar sinais clínicos e lesões similares. Isso inclui a forma diftérica de poxvírus e infecções causadas pelo vírus da doença de Newcastle, vírus da influenza aviária, vírus da bronquite infecciosa, adenovírus das aves e *Aspergillus* spp (RODRÍGUEZ-AVILA et al., 2008).

10. TRATAMENTO

Nenhuma droga mostrou-se eficaz na redução das lesões severas ou alívio nos sintomas da doença. Se o diagnóstico de LTI é obtido no início de um surto, a vacinação das aves não afetadas pode induzir proteção adequada antes de elas ficarem expostas (RODRÍGUEZ-AVILA et al., 2008).

11. PREVENÇÃO E CONTROLE

O período de latência do vírus certamente é o maior impedimento para os programas de controle da LTI. No entanto, a restrição de hospedeiros, a instabilidade do vírus no meio ambiente e a ineficiência da transmissão vertical, são fatores que permitem que ações restritivas para evitar a disseminação da doença, como a eliminação das aves afetadas ou identificadas como albergando a forma latente do vírus e a vacinação, possam ter resultados eficientes (BRANDÃO; CHACÓN, 2009).

No campo, surtos de LTI acontecem entre lotes não vacinados que se misturam com lotes vacinados. Esses surtos são explicados pela disseminação do vírus vacinal, que pode ganhar virulência depois da passagem ave a ave. Portanto, as medidas de biossegurança devem ter por objetivo evitar o contato de aves susceptíveis com vírus de campo e/ou vacinal (BRANDÃO; CHACÓN, 2009).

Em casos de surtos, as medidas devem incluir: diagnóstico rápido, estabelecimento de um programa vacinal e prevenção da disseminação do vírus (BRANDÃO; CHACÓN, 2009).

11.1. Vacinação

Inicialmente foi realizada vacinação com sucesso para LTI utilizando vírus aplicado à cloaca (GUY; BARNES; SMITH, 1991). Posteriormente, foi demonstrado que a imunidade pode ser fornecida pela vacinação de frangos por meio de seios infraorbital, instilação intranasal, folículos de pena, e água potável com cepas LTI de baixa virulência atenuadas ou vírus vivos modificados (GUY; BARNES; SMITH, 1991).

Os dois principais tipos de vacinas disponíveis comercialmente em VLT nos EUA são: a atenuada por passagens sequenciais em embriões de galinha (CEO), e a atenuada por passagens em cultura de tecidos (TCO). Estas vacinas atenuadas induzem proteção, impedindo os sinais clínicos e a mortalidade (RODRÍGUEZ-AVILA et al., 2008).

A rota de vacinação é extremamente importante, pois algumas das vacinas vivas atenuadas disponíveis proporcionam diferentes graus de proteção, particularmente quando aplicadas por aspersão ou na água de beber (RODRÍGUEZ-AVILA et al., 2008).

A vacinação utilizando cepas vivas atenuadas por múltiplas passagens em ovos embrionados ou cultivo celular tem sido a principal forma utilizada para controlar a disseminação do VLTÍ. Entretanto, o vírus latente pode ser reativado por fatores de estresse e pode ser transmitido de uma ave portadora para aves susceptíveis, representando um sério problema e comprometendo esforços para o controle desta enfermidade (RODRÍGUEZ-AVILA et al., 2008).

Tanto cepas de campo quanto as vacinais produzem infecções latentes (PORTZ, 2008). Consequentemente, a vacinação é, geralmente, limitada a áreas onde a doença é endêmica. Em áreas onde a doença existe, é difícil ou quase impossível manter plantéis livres da infecção. Nesses lugares, a maioria das aves de vida longa é rotineiramente vacinada contra VLTÍ (GAMA; CANAL, 2009).

Por outro lado, frangos de corte são vacinados com aproximadamente quatorze dias de idade apenas quando houver surtos (GAMA; CANAL, 2009). Em aves de vida longa o VLTÍ é controlado por vacinas atenuadas dadas por colírio ou por uma vacina recombinante da varíola aviária administrada por injeção. Contudo, em frangos de corte, vacinas aplicadas individualmente não são economicamente viáveis, devendo ser executadas por aspersão ou água potável (GIAMBRONE; FAGBOHUN; MACKLIN, 2008).

Importante destacar que a vacina viva modificada tem sido associada com vários efeitos adversos como a disseminação do vírus vacinal a animais não vacinados, atenuação insuficiente, produção de animais portadores com infecção latente, e aumento da virulência como resultado da passagem *in vivo* (ave a ave) (BRANDÃO; CHACÓN, 2009). Os frangos de corte podem desenvolver traqueíte leve, reduzir o ganho de peso e diminuir a eficiência alimentar que são comumente associados com o VLTÍ clínico (GIAMBRONE; FAGBOHUN; MACKLIN, 2008).

Assim, o VLTi ainda não é passível de erradicação com as ferramentas tradicionais de diagnóstico e controle disponíveis, e o curso da doença e disseminação viral vão depender do controle de inúmeros fatores predisponentes extrínsecos e intrínsecos ao hospedeiro e ao vírus (GIAMBRONE; FAGBOHUN; MACKLIN, 2008).

12. CONCLUSÃO

As doenças respiratórias são um dos principais desafios sanitários dentro de uma criação avícola, pois levam à condenação de carcaças, e perdas na produtividade do plantel. Dentro deste contexto, podemos citar a LTI, uma importante doença que desencadeia grande impacto econômico mundial, devido a fácil disseminação do vírus por todo o mundo e ao fato da infecção permanecer em latência por vários meses, contribuindo para a permanência e disseminação do vírus no plantel. Importante a conscientização do produtor sobre a necessidade de notificação da doença à OIE, pois só assim um controle adequado pode ser realizado evitando surtos em nosso país. Existe ainda, a possibilidade de realizar a vacinação, porém esta pode produzir aves portadoras com infecção latente e pode disseminar o vírus para as aves não vacinadas. Por isso, as granjas precisam manter uma boa biossegurança e realizar métodos de diagnóstico eficiente a fim de conter a infecção no início, evitando maiores frustrações.

13. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRANDÃO, Paulo Eduardo; CHACÓN, Jorge Luis. Laringotraqueíte Infecciosa. In: REVOLLEDO, Liliana; FERREIRA, Antonio J. Piantino. **Patologia Aviária**. Barueri: Manole Ltda, 2009. Cap. 26, p. 276-281.

CREELAN, Julie L. et al. Rapid detection and characterization from field cases of infectious laryngotracheitis virus by real-time polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism. **Avian Pathology**, Liverpool, v. 35, n. 2, p.173-179, abr. 2006.

GAMA, N. M. S. Q; CANAL, C. W. Laringotraqueíte Infecciosa das Galinhas. In: B. JÚNIOR, A.; MACARI, M.. **Doenças das Aves**. 2. ed. Campinas: Facta, 2009. p. 787-800.

GELENCZEI, E. F.; MARTY, E. W.. Studies on a Tissue-Culture-Modified Infectious Laryngotracheitis Virus. **Avian Diseases**, Arizona, v. 8, n. 1, p.105-122, Fev. 1964.

GIAMBRONE, J. J.; FAGBOHUN, O.; MACKLIN, K. S.. Management Practices to Reduce Infectious Laryngotracheitis Virus in Poultry Litter. **Poultry Science**, Milwaukee, p.64-68, 2008.

GUY, James S.; BARNES, H. John; SMITH, Lynda. Increased Virulence of Modified-Live Infectious Laryngotracheitis Vaccine Virus Following Bird-to-Bird Passage. **Avian Diseases**, Arizona, v. 35, n. 2, p.348-355, abr./jun. 1991.

GUY, J. S.; GARCIA, M.. Laryngotracheitis. In: SAIF, Y. M.. **Diseases of poultry**. Oxford: Blackwell Publishing Ltd, 2008. p. 137-146.

HAN, M. G. et al. Pathogenicity and vaccine efficacy of a thymidine kinase gene deleted infectious laryngotracheitis virus expressing the green fluorescent protein gene. **Archives Of Virology**, Wien, p.1017-1031, 18 abr. 2002.

LOUDOVARIS, T. et al. Genetic susceptibility of chicken macrophages to in vitro infection with infectious laryngotracheitis virus. **Avian Pathology**, Liverpool, v. 20, n. 2, p.291-302, 1991.

LÜSCHOW, Dörte et al. Protection of chickens from lethal avian influenza A virus infection by live-virus vaccination with infectious laryngotracheitis virus recombinants expressing the hemagglutinin (H5) gene. **Vaccine**, Surrey, v. 19, n. 30, p.4249-4259, 20 jul. 2001.

MARTINS, N. R. Da Silva et al. Local and systemic antibody class responses to an infectious laryngotracheitis virus vaccine strain. **Avian Pathology**, Liverpool, v. 21, n. 1, p.97-106, 1992.

PORTZ, Cristiana. **Caracterização biológica e molecular de amostras brasileiras do vírus da laringotraqueíte infecciosa**. 2008. 116 f. Dissertação (Doutorado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

POULSENT, David J.; KEELER JUNIOR, Calvin L.. Characterization of the assembly and processing of infectious laryngotracheitis virus glycoprotein B. **Journal Of General Virology**, Newark, p.2945-2951, 1997.

RACHAMADUGU, Rakesh et al. Identification and expression analysis of infectious laryngotracheitis virus encoding microRNAs. **Virus Genes**, Fayetteville, p.301-308, 29 ago. 2009.

RODRÍGUEZ-AVILA, Andrés et al. Evaluation of the protection elicited by direct and indirect exposure to live attenuated infectious laryngotracheitis virus vaccines against a recent challenge strain from the United States. **Avian Pathology**, Liverpool, v. 37, n. 3, p.287-292, jun. 2008.

SCHNITZLEIN, William M.; RADZEVICIUS, Jane; TRIPATHY, Deoki N.. Propagation of Infectious Laryngotracheitis Virus in an Avian Liver Cell Line. **Avian Diseases**, Arizona, v. 38, n. 2, p.211-217, abr./jun. 1994. Disponível em: <<http://www.jstor.org/stable/pdfplus/1591939.pdf>>. Acesso em: 25 fev. 2010.

VILLANUEVA, Jorge Luis Chacón. **Vírus da Laringotraqueíte Infecciosa: detecção e caracterização molecular, isolamento, diagnóstico diferencial e epidemiologia de um surto em granjas de poedeiras comerciais na região de Bastos, Estado de São Paulo**. 2005. 116 f. Dissertação (Mestrado) - Usp, São Paulo, 2005.

ZHAOGANG, Sun; MANFU, Zhang. Effect of the infectious laryngotracheitis virus (ILTV) glycoprotein G on virus attachment, penetration, growth curve and direct cell-to-cell spread. **Science In China**, Beijing, v. 48, n. 5, p.487-494, 2005.