

CAPACITAÇÃO DE PESQUISADORES DO IB PARA O DIAGNÓSTICO DE LTI DAS GALINHAS

Nilce Maria Soares- PqC VI, Laboratório de Patologia Avícola/IB/Bastos

updbastos@biologico.sp.gov.br

A Laringotraqueíte Infecciosa das Aves (LTI) é uma enfermidade causada por herpesvírus e sua manifestação clínica pode ocorrer de grau leve a severo, dependente de fatores como: transporte, manejo ruim, adensamento, multiplicidade de idade, estresses e doenças intercorrentes. O vírus apresenta a capacidade de iludir a resposta imune, estabelecendo nas aves recuperadas a latência, principalmente nos nervos trigêmeos, com eliminação intermitente em condições de estresse. É uma doença de distribuição geográfica cosmopolita, e ocorrências são freqüentemente relatadas em áreas de grande concentração avícola. No Brasil a doença era considerada exótica até 2003, embora, houvesse trabalhos científicos publicados, relatando sua ocorrência nas regiões sudeste e sul.

Na região de Bastos/SP, área de maior concentração de granjas de aves de postura no Brasil, a avicultura enfrentou problema de LTI a partir de 2002, com manifestação em frangas e aves adultas com comprometimento respiratório de grau leve a severo, redução da postura de ovos e aumento da taxa de mortalidade. Os lotes não respondiam aos procedimentos convencionais de controle praticados e os indicadores de produtividade e de saúde apresentavam-se comprometidos. A suspeita de (LTI) em galinhas da região de Bastos, foi notificada em 27/12/2002 ao DSA do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). A Coordenadoria de Defesa Agropecuária instituiu um programa de saúde animal para o controle da doença, amparado por instrumentos legais. Para a manutenção da condição sanitária alcançada se fez a necessário implementar as medidas de vigilâncias ativa e passiva por meio do efetivo monitoramento sanitário dos plantéis, com o estabelecimento dos critérios de inspeções sistemáticas das condições de saúde das aves, associado a uma metodologia de colheita de materiais, processamento laboratorial e interpretação dos resultados.

No final de 2008 foi aprovado no CNPq o projeto “Capacitação técnica de equipe multidisciplinar para o programa oficial de controle da erradicação e diagnóstico de laringotraqueíte infecciosa das galinhas, na região de Bastos, Estado de São Paulo”. O objetivo foi promover a capacitação dos profissionais da Secretaria da Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo (Instituto Biológico e Coordenadoria de Defesa Agropecuária), junto ao Centro de Referência Internacional de Pesquisa e Diagnóstico das Doenças Aviárias da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade da Geórgia (PDRC-UGA), para as técnicas de profilaxia e diagnóstico, auxiliando a elaboração de metodologias e execução das atividades do programa oficial de controle da LTI, na região de Bastos/SP.

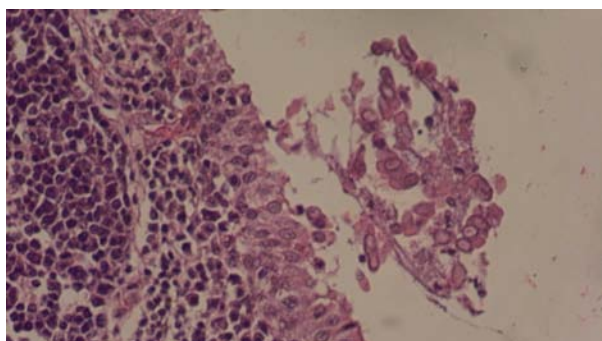
O gerenciamento do projeto é realizado pela pesquisadora Nilce Maria Soares da Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento de Bastos/IB. A capacitação dos profissionais do Instituto Biológico foi realizada no LANAGRO-Laboratório Nacional Agropecuário e no Centro de Referência Internacional de Pesquisa e Diagnóstico das Doenças Aviárias da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade da Geórgia (PDRC-UGA) durante o ano de 2009, proporcionando o conhecimento necessário para a padronização

dos procedimentos técnicos e científicos, referentes ao diagnóstico da LTI e sua implantação no Instituto Biológico. Com isto, a Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento de Bastos/IB conquistou o credenciamento, junto ao MAPA, para realizar os exames sorológicos do VLTI.

A realização das provas sorológicas em combinação com a reação de PCR convencional e o exame histopatológico, são os ensaios mais utilizados no diagnóstico do LTI. Outra prova molecular utilizada é o PCR em tempo real (ReTi-PCR). Esta reação é rápida, sensível, apresentando elevada reprodutibilidade e riscos reduzidos de contaminação cruzada.

Durante o ano de 2009, os Pesquisadores Claudia Del Fava, Marcos Roberto Buim, Alice Akimi Ikuno e Renato Luis Luciano, desenvolveram atividades de treinamento sob a orientação dos Drs. John R. Glisson, Maricarmen García, Guillermo Zavala e Susan Williams, especialistas do PDRC-UGA/Athens/EUA. A pesquisadora Claudia Del Fava desenvolveu o treinamento em diagnóstico histopatológico diferencial das enfermidades do trato respiratório de aves com a Dra. Susan Williams, anatomopatologista responsável técnico pelo diagnóstico histopatológico do PDRC-UGA. Foi realizada a triagem das amostras suspeitas de LTI, fixadas em formol tamponado e emblocadas em parafina, a partir do qual são realizados cortes histológicos corados pela hematoxilina/eosina (HE). É um método diagnóstico rápido, pois permite a liberação de resultados em até 24 horas, desde que o laboratório de histotécnica esteja automatizado. O exame histopatológico busca fundamentalmente a identificação da inclusão viral eosinofílica no núcleo das células epiteliais da mucosa conjuntiva e do trato respiratório (seios infra-orbitários, laringe e traquéia), sendo esta lesão patognomônica em aves enfermas no estágio inicial da doença, de 5 a 7 dias após a infecção. Nos casos severos, quando ocorre desprendimento da mucosa, as inclusões intra nucleares podem ser observadas nos debris celulares do lúmen da traquéia. As amostras inconclusivas na coloração HE devem ser submetidas à imunistoquímica e ou PCR para comprovação da infecção viral

Figura 01- Corte histológico de traquéia visualizando células com corpúsculo de inclusão intranuclear.

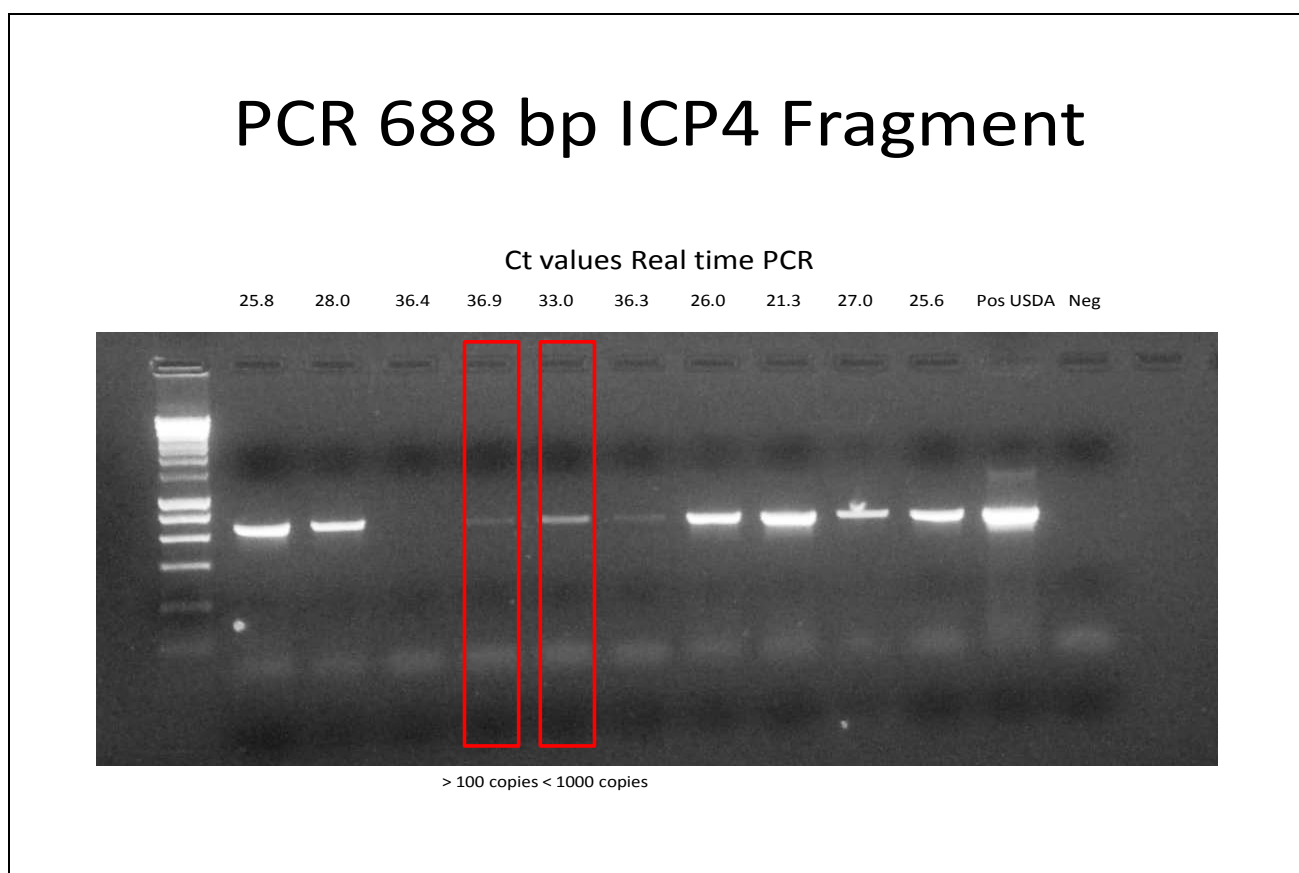


Marcos Roberto Buim, pesquisador da UPDBastos, desenvolveu o treinamento das técnicas sorológicas no LANAGRO e das técnicas biomoleculares para diagnóstico da LTI, no PDRC-UGA. No laboratório de Doenças Aviárias do LANAGRO de Campinas, Marcos Buim realizou o treinamento para as técnicas de ELISA e imunodifusão em gel de agar, utilizando kits da empresa Hipra e Charles River, sob a supervisão de Dr^a Dilmara Reischak. No laboratório de virologia do PDRC-UGA, os pesquisadores Marcos Roberto Buim, Alice Akimi Ikuno e Renato Luis Luciano desenvolveram os trabalhos de biologia molecular com a Dra. Maricarmen García, que enfatizou a necessidade de se realizar o diagnóstico da LTI pela PCR

convencional ou em tempo real, tendo em vista que são provas rápidas, específicas e sensíveis. Foi realizada uma PCR em tempo real e uma reação de PCR convencional e comparada a sensibilidade analítica das técnicas.

A figura 02 demonstra este teste de sensibilidade, onde os “Ct values Real time PCR” são referentes à análise pela PCR em tempo real, onde os valores de 36.9 e 33.0 correspondem a uma quantidade de DNA >100 cópias e < 1000 cópias, respectivamente. Pela PCR convencional podemos visualizar neste gel a formação de bandas positivas referentes aos valores acima mencionados. Com base nestes resultados, concluiu-se que o protocolo da PCR convencional, pode ser aplicado com segurança no diagnóstico da LTI.

Figura 02



Dando continuidade aos estudos moleculares, foi utilizado o trabalho utilizando as enzimas “ApoI”, “Bccl” e “HhaI”. O perfil de restrição está apresentado no Tabela 1.

Tabela 1- Resultado do Perfil de restrição do VLTI enzimas

Amostras de VLTI	Enzimas de restrição		
	ApoI	Bccl	HhaI
CEO	-	+/-	-
TCO	+	-	-
Campo	+	-	+

Dra. Maricarmen García recomendou que a PCR utilizando estas enzimas de restrição seja realizada em todas as amostras brasileiras, isoladas a partir de 2003, e para isso deveremos firmar uma parceria com o Dr. Antonio Piantino Ferreira, do Laboratório de Patologia da FMVZ USP, que possui estas amostras isoladas e seqüenciadas. Este trabalho é importante para dar continuidade a este projeto de capacitação, diferenciando amostras de VLTI brasileiras vacinais e de campo, bem como buscar ferramentas que possam ser aplicadas no diagnóstico laboratorial do Bolsão de Bastos. A genotipagem das amostras de vírus da LTI por meio da PCR com enzimas de restrição (RFLP) para diferenciar o vírus de campo do vírus vacinal na região de Bastos/SP é importante, tendo em vista que se utiliza vacina com vírus vivo produzida em embrião de galinha e cultura de células. Para estudos epidemiológicos é fundamental esta diferenciação, tendo em vista que o vírus vacinal pode causar enfermidade pela possibilidade de reversão de patogenicidade, resultante da passagem do vírus vacinal em galinhas.

CULTURA CELULAR DE RINS DE GALINHA

Dando prosseguimento ao programa de treinamento, Alice Akimi Ikuno e Renato Luis Luciano desenvolveram o treinamento em diagnóstico da LTI por isolamento viral. Suspensões de raspados de traquéias de galinha com LTI foram homogeneizadas e inoculadas em células primárias confluentes de rim. As culturas celulares foram monitoradas diariamente por 3–5 dias para observação do efeito citopático característico do vírus. A Figura 3 ilustra os resultados do isolamento viral da LTI.

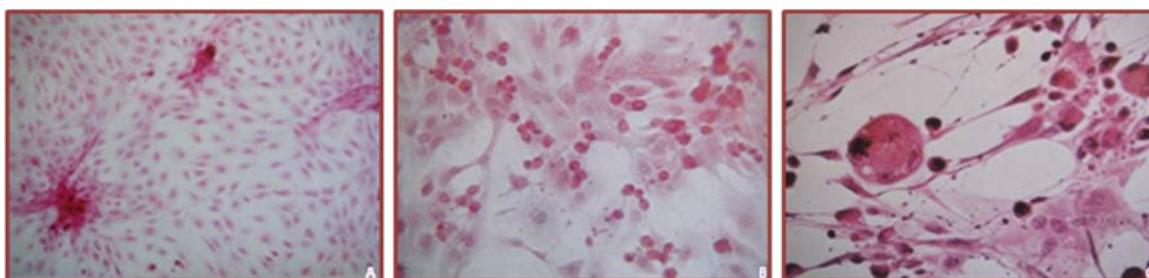


Figura 3. A- cultura celular normal, B- cultura celular 24 h após a inoculação do vírus, C- efeito citopático é observado através de células arredondadas e gigantes com inclusões intranucleares.

ISOLAMENTO VIRAL EM OVOS EMBRIONADOS

Foi realizada a inoculação do vírus da LTI em ovos embrionados de galinha SPF de 9-11 dias de idade, via membrana corioalantóide (MCA). Procedeu-se a incubação e o exame diário para verificação do espessamento e formação de *pocks* na membrana. Este processo ocorre 3 dias após a inoculação do vírus, conforme ilustrado na Figura 4.

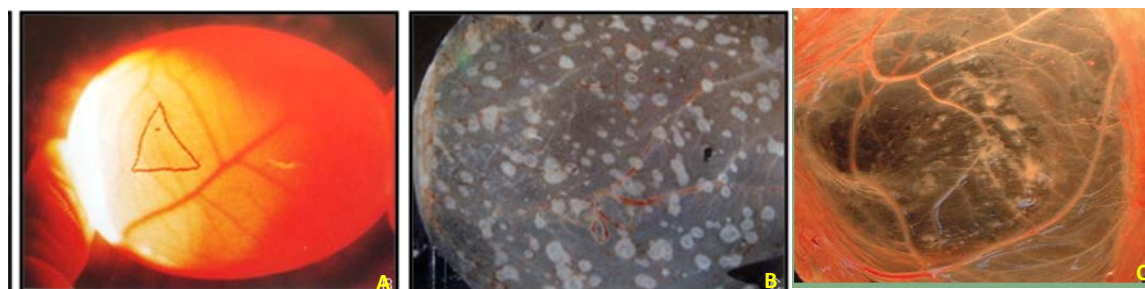


Figura - A- Inoculação na MCA de ovo embrionado, B- MCA após 3 dias de inoculação, C- Necrose na MCA de ovo embrionado inoculado com o vírus da LTI

Para o Instituto Biológico, o treinamento técnico focou as principais técnicas para o diagnóstico para o diagnóstico do VLTI. O conhecimento técnico-científico adquirido possibilitou o desenvolvimento e a implantação das técnicas no Instituto Biológico, permitindo que a Instituição realize as análises para o monitoramento oficial de controle da LTI nas da Região de Bastos, além de estar preparado para receber e processar amostras de empresas avícolas de todo território brasileiro.