

U. PORTOINSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR
UNIVERSIDADE DO PORTO

Relatório Final de Estágio
Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

CIÊNCIA AVÍCOLA: UMA PERSPETIVA LABORATORIAL

Jorge Miguel Carvalho dos Reis Branco de Matos

Orientador

Professor Doutor Paulo Manuel Rodrigues Martins da Costa

Co-Orientador

Professor Doutor Michael Hess

Porto 2013

U. PORTO



INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR
UNIVERSIDADE DO PORTO

Relatório Final de Estágio

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

CIÊNCIA AVÍCOLA: UMA PERSPETIVA LABORATORIAL

Jorge Miguel Carvalho dos Reis Branco de Matos

Orientador

Professor Doutor Paulo Manuel Rodrigues Martins da Costa

Co-Orientador

Professor Doutor Michael Hess

Porto 2013

Resumo

O presente relatório foi desenvolvido no âmbito do estágio curricular do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, realizado entre os dias 14 de Janeiro de 2013 e 3 de Maio de 2013. Este estágio foi realizado na *Clinic for Avian, Reptile and Fish Medicine* da Universidade de Medicina Veterinária de Viena e teve como principal foco a patologia clínica na avicultura. O estágio foi dividido em duas partes: a primeira centrada no trabalho de rotina daquela unidade clínica, mais especificamente o diagnóstico e controlo de agentes infecciosos; a segunda integrando um projeto de investigação em curso.

A *Clinic for Avian, Reptile and Fish Medicine* oferece serviços de diagnóstico e controlo de agentes infecciosos, quer a veterinários, quer a produtores. No âmbito desta missão houve a oportunidade de integrar a rotina de trabalho que incluía: o diagnóstico de salmonela na indústria avícola; o exame bacteriológico de órgãos ou de amostras ambientais e a determinação de perfis de resistência antibiótica; os testes sorológicos para deteção de anticorpos; a deteção, classificação e quantificação de parasitas nas fezes por métodos padronizados; a deteção e isolamento de diferentes vírus em sistemas de cultura apropriados; a deteção de agentes microbianos por *Polymerase Chain Reaction*; os estudos anátomo-patológicos, em carcaças, e a recolha de amostras para posterior processamento.

Um outro alicerce daquela unidade é o da investigação. Neste capítulo houve a oportunidade de integrar um projeto de investigação que consistiu num ensaio clínico para o estudo da bactéria *Gallibacterium anatis* em galinhas poedeiras com imunossupressão seletiva. A participação neste projeto permitiu a aquisição de competências no âmbito dos procedimentos experimentais que suportam um ensaio em que há necessidade de recorrer à experimentação animal.

Os objetivos a que me propus para este estágio foram compreender a importância da visão integralista do Médico Veterinário e do seu espírito investigador para a dinamização da avicultura, desenvolver uma consciência de abordagem global e profunda associada a uma indústria avícola em mudança e por isso compreender a necessidade de respostas adequadas para os desafios diários. A abordagem e o trabalho experimentado contribuíram para desenvolver uma perceção do papel da Universidade quanto ao desenvolvimento sustentado da indústria avícola.

Agradecimentos

Este relatório assinala o fim de um percurso na minha vida que me marcou profundamente, quer a nível profissional, quer a nível pessoal. Posto isto, tenho que agradecer a um vasto conjunto de pessoas que encontrei neste percurso e que contribuíram para aquilo que eu hoje sou.

Ao Professor Doutor Paulo Costa, meu orientador, deixo um agradecimento especial por toda a disponibilidade, apoio, dedicação e amizade. Obrigado por me ter dado direções “para onde olhar”, mas sempre com o cuidado de não me dizer o que “ver”.

A todos os Professores do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária que participaram na minha formação académica, um muito obrigado.

Ao Dr. Álvaro Santos Pereira, da Provimi, obrigado por me ter introduzido à avicultura nacional, permitindo acompanhá-lo nas suas visitas a explorações avícolas.

Ao Dr. José Vieira e ao Engenheiro António Gomes, da Savinor, agradeço terem-me dado a oportunidade de tomar contacto com a vida e rotina de uma granja avícola.

Ao Professor Doutor Michael Hess, um muito obrigado por me ter recebido na *Clinic for Avian, Reptile and Fish Medicine* da Universidade de Medicina Veterinária de Viena.

À Doutora Claudia Hess, agradeço profundamente por me ter acompanhado diariamente durante o meu estágio, em Viena, pela disponibilidade, pela simpatia e generosidade. Muito obrigado por todo o conhecimento partilhado, por todos os desafios colocados e por toda a compreensão e ajuda.

À Dra. Silvia pela amizade, boa disposição, ensino e por todos os bons momentos passados.

Ao Doutor Dieter Liebhart agradeço a simpatia, o tempo disponibilizado e por todos os desafios no âmbito da histologia.

Ao Basel, um muito obrigado pela amizade, simpatia e pelo tempo despendido a ensinar os procedimentos de isolamento viral em ovos embrionados.

Ao Surya Paudel, fico profundamente grato por me ter deixado integrar o seu ensaio experimental, tendo-me dado oportunidade de aprender imenso e realizar vários procedimentos práticos no âmbito do seu ensaio. Um muito obrigado pelo tempo disponibilizado, pela grande amizade, pela partilha de conhecimentos e por todos os bons momentos.

Ao Tarik, pela excelente amizade, fraternidade, companheirismo e por todas as noites frias de futebol, aquecidas por cerveja.

Aos outros estudantes de Doutoramento da *Clinic for Avian, Reptile and Fish Medicine* da Universidade de Medicina Veterinária de Viena, nomeadamente à Anna, à Connie, à Angelika, ao Zhang e ao Imtiaz, um muito obrigado por me terem recebido de forma tão fraterna, por toda a amizade, simpatia e ensinamentos transmitidos.

Ao Marcus pela boa disposição, amizade, companheirismo e pelas imensas gargalhadas que me proporcionou.

À Tuna Académica de Biomédicas, fico profundamente grato por ter sido uma segunda família, durante o meu percurso, recebendo-me no seu seio numa fase embrionária da minha vida académica. Agradeço profundamente a todas as pessoas que se cruzaram comigo neste magnífico projeto, por todos os fins-de-semana ocupados e por todas as noites mal dormidas

que desaguaram em grandes momentos vividos e foram, provavelmente, dos melhores anos da minha vida. “São jantares, atuações, serenatas e paixões que para sempre vou guardar”.

A todos os meus muitos colegas de curso, o meu agradecimento pela amizade, partilha e companheirismo ao longo destes anos.

Aos residentes da Bandeirinha, com os quais tive o prazer de conhecer e conviver, David, Melão, Pedrosa, João, Pedro, Hélder, Zé, Saraiva, Rúben, Joel, Ricardo, André, Daniel e Luís, o meu muito obrigado pelo ambiente familiar, por tudo o que me ensinaram, pela grande amizade, companheirismo e entreajuda.

À Silvana, agradeço do fundo do coração todo o carinho, amor, amizade, compreensão e por se manter a meu lado nos últimos 4 anos de desafios e aventuras, tendo-me apoiado sempre que necessitei.

Por fim, aos meus pais Aurélio e Esperança, e ao meu irmão João, agradeço por todos os conselhos, apoio inestimável e força, assim como, pela compreensão e sacrifícios suportados ao longo do meu percurso.

“Tell me and I forget. Teach me and I remember. Involve me and I learn.”

Benjamin Franklin

Abreviaturas

ADN – Ácido desoxirribonucleico

APT – Água peptonada tamponada

ARN – Ácido ribonucleico

BHI – *Brain heart infusion*

BPLS – *Brilliant-green phenol-red lactose sucrose*

cm - Centímetro

COS – *Columbia agar + 5% sheep blood*

EDTA - Ácido etilendiamino tetra-acético

ELISA – *Enzyme-linked immunosorbent assay*

e.g. – *exempli gratia*

et al. – *et alii*

g - Grama

HAEM2 – *Chocolate haemophilus 2*

kg – Quilograma

l - Litro

MKTTn – *Muller-kauffmann tetrathionate novobiocin*

ml - Mililitro

mm - Milímetro

MRSV - *Rappaport–vassiliadis semisolid modified*

PBS – *Phosphate buffered saline*

PCR – *Polymerase chain reaction*

p.i. – Pós infecção

rpm – Rotações por minuto

RVS – *Rappaport–vassiliadis Salmonella*

SAA – *Serum amyloid A*

SCS – *Schaedler agar + 5% sheep blood*

SGC2 – *Sabouraud gentamicin chloramphenicol 2*

SPF - *Specified pathogen free*

spp. - Espécies

UFC – Unidades formadoras de colónias

x – Ampliação

XLD – *Xylose lysine desoxycholate*

µl – Microlitro

° C – Graus celsius

% - Percentagem

° - Graus

Índice

Resumo	iii
Agradecimentos	iv
Abreviaturas	vi
I. Diagnóstico e controlo de agentes infecciosos	1
1. Bacteriologia	1
1.1. Diagnóstico de salmonela na indústria avícola	1
1.1.1. Introdução	1
1.1.2. <i>Salmonella enterica</i> na cadeia alimentar: um problema de saúde pública	2
1.1.3. Controlo de salmonela na Comunidade Europeia	3
1.1.4. Isolamento e identificação	3
1.1.4.1. Amostras para processamento	3
1.1.4.2. Métodos de cultura padronizados	4
1.1.4.3. Procedimento	4
2. Sorologia	5
2.1. Monitorização sorológica	5
2.2. Interpretação dos dados sorológicos	6
2.3. Testes sorológicos	6
2.3.1. Teste de aglutinação rápida	6
2.3.2. Teste de precipitação em agar-gel	7
2.3.3. <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>	7
3. Parasitologia	8
3.1. Nemátodes	8
3.2. Coccídias	9
3.3. Técnicas laboratoriais de diagnóstico	10
3.3.1. Exame coproparasitológico	10
3.3.1.1. Teste de flutuação (teste qualitativo)	10
3.3.1.2. Teste de McMaster (teste quantitativo)	10
3.3.2. Estudo parasitológico durante a necrópsia	11
4. Virologia	12
4.1. Amostras para isolamento viral	12
4.2. Multiplicação e isolamento viral em ovos de galinha embrionados	12
4.3. <i>Polymerase Chain Reaction</i>	13
5. Anatomia patológica	14

5.1. Procedimentos de diagnóstico anátomo-patológico	14
5.2. História	14
5.3. Exame externo.....	14
5.4. Técnica de necrópsia.....	14
5.5. Casos clínicos.....	15
5.5.1. Coliseticémia em galinhas poedeiras	15
5.5.2. Parasitismo por <i>Amidostomum anseris</i> e amiloidose.....	17
5.5.3. Variola aviária (forma cutânea)	19
II. Investigação	21
6. Ensaio experimental	21
6.1. Introdução.....	21
6.2. Ovos para incubação	22
6.3. Incubação	22
6.3.1. Temperatura.....	23
6.3.2. Humidade.....	23
6.3.3. Movimento.....	23
6.4. Alojamento.....	24
6.5. Marcação	24
6.6. Maneio.....	24
6.7. Procedimentos experimentais.....	25
6.7.1. Administrações.....	25
6.7.1.1. Agentes farmacológicos.....	25
6.7.1.2. Inóculo infeccioso	26
6.7.2. Necrópsia	26
III. Considerações finais	27
IV. Bibliografia.....	28
V. Anexos	I
Anexo I – Bacteriologia	I
Anexo II - Sorologia	I
Anexo III - Parasitologia.....	II
Anexo IV - Virologia	II
Anexo V – Anatomia patológica	IV
Anexo VI – Ensaio experimental	VII

I. Diagnóstico e controlo de agentes infecciosos

A unidade clínica em que tive a oportunidade de estagiar, pertencendo a uma Universidade, fornece uma grande diversidade de serviços à indústria. Esta ambivalência serve simultaneamente os propósitos de ensino e de um setor da economia, quando este procura uma resposta multidisciplinar para responder às necessidades e problemas que surgem diariamente. Desta forma, a existência de instalações e recursos de filosofia abrangentes, permitem uma abordagem mais integrada dos problemas e, ao mesmo tempo, ao veterinário de desenvolver competências em áreas diversas essenciais ao despertar de uma visão científica global.

Nesta secção será descrito o conhecimento adquirido no trabalho de rotina levado a cabo na *Clinic for Avian, Reptile and Fish Medicine* que apresenta um cariz multidisciplinar e que, por isso, decidi abordá-lo de uma forma estruturada nas diferentes áreas: bacteriologia, sorologia, parasitologia, virologia e anatomia patológica.

1. Bacteriologia

A área bacteriológica revela-se de grande importância, sobretudo no que diz respeito ao controlo microbiológico na indústria avícola. Na rotina clínica eram três as principais áreas de intervenção: o diagnóstico de salmonela, o exame bacteriológico de órgãos ou de amostras ambientais e a determinação de perfis de suscetibilidade aos antimicrobianos. Contudo decidi privilegiar neste capítulo a temática relativamente à salmonela, não só pela atenção que atrai na avicultura e saúde pública, mas também pela grande importância e peso que tinha na prática diária.

1.1. Diagnóstico de salmonela na indústria avícola

1.1.1. Introdução

A *Salmonella enterica* pertence à Família das *Enterobacteriaceae* e pode ser dividida em 2400 serovarietades com antígenos distintos (Wallis 2006). A maioria dos casos de salmonelose que ocorrem no Homem ou em animais domésticos, é causada por apenas algumas serovarietades que podem ser divididas em dois principais grupos, dependendo do seu comportamento de colonização e da sua propensão em produzir doença sistémica (Wallis 2006). No primeiro grupo estão incluídas as serovarietades adaptadas ao hospedeiro, sendo estes infetados via oro-fecal. Os seus membros constituintes causam doença apenas num número limitado de espécies, relacionadas filogeneticamente (Wallis 2006). No segundo grupo incluem-se a maioria das serovarietades remanescentes e são, geralmente, incapazes de provocar doença sistémica em animais adultos, saudáveis e livres de stress, colonizando de forma eficiente o trato digestivo de animais, mas sem produzirem doença (Wallis 2006). Desta forma, assumem especial importância em virtude de entrarem na cadeia alimentar, desencadeando surtos esporádicos de salmonelose humana. As duas serovarietades que apresentam este comportamento e que são mais frequentemente associadas a doença humana na Europa são as serovarietades Typhimurium e Enteritidis (Humphrey 2006).

1.1.2. *Salmonella enterica* na cadeia alimentar: um problema de saúde pública

A *Salmonella enterica* é um agente patogénico de importância global transmitida através dos alimentos. Nos últimos 20 anos o número de infeções por *S. enterica*, na maioria dos países desenvolvidos, aumentou bastante (Angulo & Swerdlow 1999; Humphrey 1994; Riemann *et al.* 2000; Ward *et al.* 2000). Anualmente, têm sido relatados mais de 1,3 biliões de casos de salmonelose em todo o mundo, com 300 mil mortes associadas (Pang *et al.* 1995). O controlo desta bactéria na cadeia alimentar traz claros benefícios para a saúde pública, uma vez que as serovariedades de *S. enterica* são os agentes patogénicos de origem alimentar mais importantes, quer em número de mortes causadas (Adak *et al.* 2002; Kennedy *et al.* 2004; Mead *et al.* 1999), quer no impacto económico que produzem (Roberts *et al.* 2003; Voetsch *et al.* 2004).

Os veículos mais importantes de salmonelose humana são os géneros alimentícios de origem animal, particularmente a carne e os ovos de aves (Quadro 1). Apesar de existir uma tendência crescente relativamente à produção extensiva em avicultura, nos países desenvolvidos a maioria das aves destinadas à produção de carne é criada com base em sistemas intensivos, o que propicia a ampliação de oportunidades de disseminação horizontal rápida de salmonela em bandos com aves infetadas (Humphrey 2006). Para além disso, nos sistemas de produção avícola existe uma diversidade de possíveis fontes de infeção, dependendo da serovariedade de *S. enterica* e do tipo de sistema de produção utilizado. Entre essas fontes, as mais comuns são o alimento composto contaminado (Williams 1981), roedores e outros animais selvagens (Bailey *et al.* 2001; Liebana *et al.* 2003). Existe ainda uma fonte de contaminação que apresenta grande importância do ponto de vista de saúde pública e que é a transmissão vertical a partir de bandos de reprodutores infetados. Esta via privilegia as serovariedades com capacidade invasora sobre as aves e que têm a capacidade de infetar e persistir nos tecidos reprodutores (Humphrey 2006). Deste modo a *S. enterica* pode infetar ovos em formação que, posteriormente, originarão pintos infetados (McIlroy *et al.* 1989). A ingestão oral pelos pintos, imediatamente após a eclosão, levará à presença de um elevado número de salmonela no trato digestivo e a uma excreção extensiva desta nas fezes, que resultará numa transmissão horizontal rápida ainda na eclósora (Humphrey 2006).

Durante os episódios de salmonelose é importante diferenciar os de curta duração, causados por uma infeção oportunista nos animais que integram a cadeia alimentar e que por isso levam a uma contaminação dos alimentos, dos outros que constituem a grande base das infeções humanas e que resultam da persistência da *S. enterica* em determinados segmentos da produção primária. A ubiquidade das serovariedades de *S. enterica*, assim como a frequência e rapidez com que as populações bacterianas se alteram, dizem-nos que nunca será possível erradicar esta bactéria da cadeia alimentar (Humphrey 2006). Apenas estratégias efetivas que visam o controlo destes microrganismos podem ser aplicadas. Estas requerem uma implementação, combinada e sustentada de um conjunto abrangente de práticas de redução de riscos, aplicando uma metodologia científica em toda a cadeia produtiva, de forma a abranger a várias fontes potenciais de introdução de salmonela nos bandos de aves (Gast 2008).

Género alimentício	Número de surtos
Ovos	69
Carne de aves	39
Outros géneros alimentícios	41
Veículos não identificados	110

Quadro 1 – Veículos de infeções por *S. enterica* em surtos na Inglaterra e no País de Gales entre 1998 e 2002. Adaptado de Humphrey *et al.* 2006

1.1.3. Controlo de salmonela na Comunidade Europeia

A defesa da saúde pública relativamente às zoonoses tem-se apresentado como um tema de grande importância para a Comissão da Comunidade Europeia. Em 1992, a União Europeia adotou uma diretiva para monitorizar e controlar as infeções por salmonela, prevendo medidas mínimas específicas para controlar infeções por *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium em bandos reprodutores de *Gallus gallus* (Directiva do Conselho 92/117/CEE 1992). Posteriormente, o Comité Científico de Medidas Veterinárias, relacionadas com a saúde pública, considerou que as medidas vigentes eram, à data, insuficientes e que os dados epidemiológicos recolhidos pelos Estados Membros eram incompletos, não sendo totalmente comparáveis (Voss 2007). Como consequência, a Comissão recomendou o aperfeiçoamento dos sistemas de controlo existentes para agentes zoonóticos específicos e em Novembro de 2003 implementou: a Directiva 2003/99/CE, relativamente à monitorização de zoonoses e agentes zoonóticos, alterando a Decisão do Conselho 90/424/CEE e revogando a Directiva do Conselho 92/117/CEE; o Regulamento (CE) N.º 2160/2003 do Parlamento Europeu e do Conselho de 17 de Novembro de 2003 relativamente ao controlo de salmonelas e outros agentes zoonóticos de origem alimentar. O objetivo deste último é assegurar a adoção de medidas apropriadas e efetivas na deteção e controlo de salmonela e outros agentes zoonóticos em todas as fases relevantes de produção, processamento e distribuição, particularmente ao nível da produção primária, de forma a reduzir a sua prevalência e consequentemente o seu risco para a saúde pública. Deste modo, o Regulamento (CE) N.º 2160/2003, e especialmente o seu Anexo I, é a base do controlo coordenado da salmonelose e de outras zoonoses dentro da Comunidade Europeia, prevendo os prazos para a avaliação da prevalência, para o estabelecimento de objetivos e para a apresentação dos programas de controlo nacional, para a sua aprovação pela Comunidade Europeia e a para sua implementação.

1.1.4. Isolamento e identificação

1.1.4.1. Amostras para processamento

Para a identificação de salmonela em bandos avícolas, são obtidas amostras de uma grande variedade de fontes, principalmente tecidos, ovos e ambiente dos pavilhões.

Como existem várias serovariedades de *Salmonella enterica* altamente invasivas, e que se podem disseminar sistematicamente para numerosos tecidos internos, pode-se igualmente usar uma grande diversidade de órgãos internos para cultura (Gast 2008). Desta forma, entre o inventário de amostras processadas diariamente estavam pintos mortos no transporte, assim como pintos *in ovo* que não eclodiram, sendo colhido para cultura o coração, intestino, fígado e saco vitelino.

Algumas serovarietades de *S. enterica* altamente invasivas podem ser depositadas no conteúdo dos ovos antes da postura (Humphrey 2006; Gast 2008), o que os torna um elemento importante no diagnóstico e monitorização

Considerando que as infeções por *S. enterica* quase que invariavelmente envolvem colonização do trato intestinal, amostras de fezes e zaragatoas cloacais também perfilavam entre o inventário de amostras.

A propagação por via fecal de salmonela nos pavilhões avícolas, a partir de aves infetadas torna a cultura de amostras ambientais uma ferramenta importante de deteção e monitorização (Gast 2008). Assim sendo, não só a colheita de amostras fecais se revela importante, pela sensibilidade na deteção de salmonela, mas também amostras de cama das aves, zaragatoas ambientais (esfregaços de gaze húmida) e botas para esfregaço (ou “meias” de gaze) compõem um leque de amostras importantes na monitorização. Outras amostras como água e alimento composto fornecido às aves, assim como pó presente nos pavilhões, são também relevantes. O pó pode permanecer contaminado com salmonela mesmo após limpeza e desinfecção dos pavilhões (Gast 2008).

Já nas incubadoras, a monitorização passa pelo processamento de amostras de papel que cobre a base nas incubadoras e que ficam cobertas de mecónio aquando da eclosão e nascimento dos pintos.

1.1.4.2. Métodos de cultura padronizados

Apesar de um diverso conjunto de condições de cultura ter sido proposto para o isolamento e identificação de salmonela, a maioria dos métodos standardizados segue um esquema geral que envolve quatro fases principais: a primeira, o pré-enriquecimento não seletivo, tem como objetivo estimular o crescimento das células microbianas, quando estas estão presentes em número reduzido ou para permitir a recuperação de células de salmonela danificadas. A segunda, o enriquecimento seletivo, permite uma expansão adicional da população de salmonela, enquanto outros organismos são suprimidos. A terceira, uma cultura em meios de agar seletivos, é usada para obter colónias isoladas (cada uma derivada de uma única célula). A quarta corresponde aos testes sorológicos de confirmação, onde colónias com características de salmonela são alvo de confirmação e identificação de serovar (Gast 2008).

1.1.4.3. Procedimento

Numa primeira fase do processamento das amostras realiza-se um pré-enriquecimento, utilizando-se como meio de cultura APT. As amostras são pesadas (aplicável nas amostras de fezes, alimento composto e pó dos pavilhões), colocando-se 25 g em 225 ml de APT. Seguidamente procede-se a uma incubação das amostras, a 37 °C, por um período de 24 horas ou de 72 horas no caso dos ovos pois, em virtude da prevalência de salmonela poder ser muito baixa no conteúdo dos ovos, é necessário prolongar o tempo de incubação de forma a permitir à população de salmonela se expandir para um nível que possibilite a sua deteção.

Numa segunda fase estimula-se o crescimento seletivo, usando-se para tal um meio semi-sólido, o MRSV. Colhe-se meio do pré-enriquecimento, recorrendo-se a uma pipeta de Pasteur, e colocam-se três gotas no centro da placa em disposição triangular. Seguidamente as placas são incubadas a 42 °C durante 24 horas. A temperatura mais elevada é importante para inibir o crescimento de organismos competitivos. Contudo, tem que se fazer uma salvaguarda para as

amostras de alimento composto, cuja especificidade e quantidades potenciais de salmonela muito baixas, exigem uma metodologia diferente. Neste caso faz-se um enriquecimento recorrendo-se a dois meios: MKTTn e o RVS. São então adicionados 0,1 ml do pré-enriquecimento a um tubo com 10 ml de RVS e 1 ml a um tubo com 10 ml de MKTTn. De seguida, o primeiro meio é incubado a 42 °C e o segundo a 37 °C, ambos por um período de 24 horas.

Após 24 horas analisam-se as placas incubadas de MRSV. Considera-se suspeito a formação de um halo claro à volta da zona inoculada (Fig. 1) e nestes casos procede-se para a uma cultura em meio seletivo. Com uma ansa colhe-se meio MRSV da zona periférica dos halos e realiza-se uma sementeira por esgotamento nos meios XLD agar e BPLS. Estes meios são incubados, a 37 °C, por mais 24 horas. As placas de MRSV com resultado negativo são colocadas, por mais 24 horas, na estufa para serem novamente analisadas.

Os meios de MKTTn e RVS, relativos ao alimento composto, são também alvo de sementeira, como descrito para o meio MRSV.

Por fim, analisam-se as placas incubadas de XLD agar e BPLS. Caso haja crescimento de colónias de salmonela (Fig. 2), realiza-se um teste de aglutinação rápida para identificar a serovariedade presente.

2. Sorologia

A sorologia é o estudo da ligação antigénio-anticorpo *in vitro* apresentando-se como uma ferramenta importante para a confirmação e caracterização dos isolados, com vista ao controlo e monitorização da saúde dos bandos.

Atualmente, os problemas causados pelas patologias representam, muitas vezes, a soma de várias perturbações subclínicas que ocorrem em diferentes tempos ao longo da vida do bando. A compreensão profunda desta coleção sequencial de dados sorológicos, e outros dados relativos a múltiplos microrganismos, requer disciplina e organização cuidadosa (Bermudez & Stewart-Brown 2008).

2.1. Monitorização sorológica

A monitorização sorológica irá estabelecer um padrão de títulos de anticorpos permitindo avaliar, quer a eficácia da administração de vacinas, quer a circulação das estirpes de campo nos bandos. Alterações nos títulos regularmente observados podem indicar uma diminuição da eficiência na administração de vacinas ou à emergência de um microrganismo patogénico particular (Bermudez & Stewart-Brown 2008).

Nos bandos de produção de broilers e perus a colheita regular de amostras de sangue, à medida que são abatidos no matadouro, pode constituir um programa efetivo de monitorização (Yegani *et al.* 2005). Quanto aos bandos de poedeiras, a monitorização deverá ser realizada antes do bando ser colocado no pavilhão, realizando-se uma monitorização sorológica periódica ao longo do ciclo de produção. Os bandos de reprodutores devem também ser monitorizados periodicamente, podendo haver necessidade de revacinação durante a produção com o objectivo de impulsionar o título de anticorpos maternos na sua descendência, se se encontrarem abaixo do pretendido (Yegani *et al.* 2005).

2.2. Interpretação dos dados sorológicos

A diferenciação dos anticorpos que são produzidos pela vacinação daqueles que são induzidos pela exposição às estirpes de campo é possível mas implica o recurso a técnicas mais caras e morosas. A única diferença que se pode observar é, possivelmente, um título de anticorpos mais elevado após uma infeção por uma estirpe de campo. Para se realizar uma interpretação válida dos resultados sorológicos é, assim, necessário possuir um conhecimento completo do historial de vacinação do bando (Bermudez & Stewart-Brown 2008).

A produção de um nível detetável de anticorpos no soro demora geralmente uma a três semanas (Yegani *et al.* 2005). É, portanto, possível colher sangue no decurso de um surto e não serem detetados níveis elevados de anticorpos contra o agente infeccioso. Contudo, se o mesmo bando for testado duas semanas depois do episódio clínico, os níveis de anticorpos no soro serão elevados. Assim, é recomendável colher amostras de soro na fase aguda e convalescente (Bermudez & Stewart-Brown 2008). Tipicamente, a amostra de soro da fase aguda, colhida durante a fase inicial do episódio, será negativa ou terá um título muito baixo relativamente aos anticorpos contra o agente suspeito. Por sua vez, as amostras de soro colhidas na fase de convalescença, logo após a recuperação do bando, se positiva ou com níveis elevados, auxiliam um diagnóstico definitivo quando interpretado em conjunto com os sinais clínicos e lesões. Um conceito importante na interpretação de resultados sorológicos é que a existência de apenas um teste sorológico positivo indica somente que o bando foi exposto àquele agente durante o seu período de vida (Bermudez & Stewart-Brown 2008).

2.3. Testes sorológicos

No trabalho de rotina clínico, os testes usados na monitorização sorológica foram o teste de aglutinação rápida, teste de precipitação em agar-gel e ELISA, apesar de existirem outros possíveis de serem utilizados (e.g. o teste da inibição da hemaglutinação, o teste da soroneutralização). O número de amostras a serem testadas em cada bando depende do nível de deteção e dos níveis de confiança necessários. No caso do comércio internacional, podem ser estipulados requisitos mínimos assim como frequência de testagem, sendo exemplo disso a Directiva do Conselho das Comunidades Europeias 90/539/CEE.

2.3.1. Teste de aglutinação rápida

O teste de aglutinação rápida é um procedimento simples, utilizado quando o antigénio em questão apresenta característica particulada. O antigénio particulado é misturado, em proporções ótimas com o anticorpo e, se o antigénio carregar os epítomos apropriados, o anticorpo liga-se a estes, estabelecendo ligações cruzadas entre antigénios, formando assim um aglutinado (Day & Schultz 2011). Este teste era utilizado para a monitorização de *Salmonella Pullorum Gallinarum*, *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae*, em bandos de reprodutores e em bandos de poedeiras.

Para se proceder ao teste de aglutinação rápida começava-se por centrifugar as amostras de sangue durante 12 minutos a 4000 rpm, sendo o soro posteriormente transferido para novos tubos. O teste era realizado sobre um azulejo liso, previamente limpo com etanol, de forma a retirar partículas que pudessem interferir com os resultados. Seguidamente era colocada uma gota de antigénio para cada amostra de soro, mais uma extra para o controlo

negativo. Ao lado de cada gota de antigénio eram depositados 20 µl de soro a testar, misturando-se seguidamente este com o antigénio. Para o controlo negativo, em vez de soro, era usado PBS. Durante cerca de 2 minutos realizavam-se movimentos oscilatórios com o azulejo, de forma a ajudar a mistura e, ao mesmo tempo, observar a formação ou não de aglutinados. A presença destes determina um resultado positivo.

2.3.2. Teste de precipitação em agar-gel

Este teste baseia-se na capacidade dos anticorpos precipitarem um antigénio solúvel, em gel de agar. A formação de um precipitado depende dos dois reagentes (antigénio e anticorpo) se apresentarem em concentrações ótimas sendo, então, capazes de formarem uma estrutura clássica em rede (Day & Schultz 2011). Apesar de ser uma técnica histórica, é ainda muito utilizada no diagnóstico de doenças infecciosas (Day & Schultz 2011). Na clínica, este teste era realizado para a monitorização de Reovírus e da Doença de Gumboro em bandos de poedeiras e de reprodutores.

Para se realizar os teste de precipitação em agar-gel começa-se por fazer sete pequenos poços com cerca de 5 mm de diâmetro, na placa de agar salino, em que seis se dispõem numa forma hexagonal e um fica no centro. Seguidamente, o antigénio é colocado no poço do centro, enquanto as amostras de soro a serem testadas são colocadas nos poços periféricos. A placa é então deixada à temperatura ambiente, num ambiente húmido, por um período de 24 horas (ou 48 horas quando não se registam resultados nas primeiras 24 horas). Durante esse tempo o antigénio difunde-se do poço central e o anticorpo (se presente) dos poços periféricos, formando-se no agar-gel uma linha branca de precipitação onde o antigénio e o anticorpo se encontram em proporções ótimas (Fig. 3) (Day & Schultz 2011). Se se utilizarem soluções com diferentes antigénios e anticorpos, estes constituintes dificilmente alcançam proporções ótimas na mesma posição. Consequentemente, é formada uma linha de precipitação separada para cada conjunto de antigénios e anticorpos que interagem. Desta forma é possível inferir sobre o grau de identidade entre as amostras a serem testadas (Tizard 2013).

2.3.3. Enzyme-linked Immunosorbent Assay

Atualmente, o teste ELISA constitui a base da maioria dos testes sorológicos utilizados no diagnóstico veterinário (Day & Schultz 2011). A forma mais comum de ELISA é usada para detetar e quantificar anticorpos específicos. Na prática clínica este teste era utilizado para o controlo sorológico de Bronquite Infecciosa, Doença de Newcastle, Laringotraqueíte Infecciosa, Anemia Infecciosa, Rinotraqueíte Aviária, Encefalomielite Aviária, Gripe Aviária, Síndrome da Queda de Postura de Ovos.

Para se realizar este ensaio usa-se uma placa de 96 poços de fundo plano. O fundo dos poços é, numa primeira fase, revestido pelo antigénio de interesse e secundariamente poderá ser usada uma proteína, sem qualquer relação, de forma a “bloquear” áreas livres que não foram revestidas pelo antigénio. As amostras de soro a testar são adicionadas individualmente em cada um dos poços. Se as amostras de soro apresentarem quantidades relevantes de anticorpos, estes vão-se ligar ao antigénio na primeira fase da reação. Como quer o antigénio, quer o anticorpo não são visíveis, é necessário um sistema secundário de deteção para se determinar se houve ou não ligação entre eles. Desta forma, após se lavar os anticorpos não

ligados dos poços, é adicionada uma solução contendo uma antiglobulina quimicamente ligada a uma enzima. Pode ser utilizada uma variedade de enzimas, contudo a mais frequentemente utilizada é a fosfatase alcalina (Day & Schultz 2011). Se o soro do animal apresentar anticorpos específicos para o antigénio de interesse, a antiglobulina ligada à enzima irá detetar e ligar-se à imunoglobulina do animal. Após lavagem, para extrair a fração de antiglobulina não ligada, é adicionado um substrato a cada poço para se iniciar uma mudança de cor (Day & Schultz 2011). A intensidade da cor é proporcional à quantidade de antiglobulina conjugada com a enzima que se ligou, o que por sua vez é proporcional à quantidade de anticorpos presente no soro a ser testado. Esta intensidade de cor irá ser medida espectrofotometricamente, num determinado tempo, quando a reação com o substrato enzimático for deliberadamente parada (Tizard 2013).

3. Parasitologia

Os sistemas de produção tecnologicamente mais evoluídos alteraram dramaticamente a importância de muitas espécies parasitárias (McDougald 2008). Em sistemas de produção de broilers ou perus, a operar segundo a prática “tudo-dentro-tudo-fora”, a apresentação de sinais clínicos é rara em virtude da redução das oportunidades de infestação e, também, pelo facto do tempo de vida de broilers e perus comerciais ser demasiado curto para haver parasitismo severo (Bermudez *et al.* 2006^c). Parasitas internos com ciclos de vida complexos, envolvendo hospedeiros intermediários, como insetos ou caracóis, assim como ectoparasitas, foram virtualmente eliminados a partir do momento em que a criação das aves se passou a realizar dentro de pavilhões, resguardados por medidas de biossegurança (Hinkle & Hinkle 2008; McDougald 2008).

Atualmente, apenas alguns parasitas são importantes em avicultura, entre os quais Nemátodes de ciclo direto e as coccídias (McDougald 2008). Todavia, uma fauna rica de parasitas pode ser encontrada em pequenos bandos criados livremente em ambientes tradicionais, em bandos de poedeiras comerciais criadas no solo e em aves criadas em regime extensivo (Fig. 4.a-b) (Bermudez *et al.* 2006^c; McDougald 2008).

3.1. Nemátodes

Os Nemátodes são o grupo de parasitas Helminthas mais importante em avicultura, quer em número de espécies, quer em número de animais infestados, quer na gravidade das lesões produzidas. Alguns Nemátodes, apresentam um ciclo de vida direto que lhes permite “prosperar” em pavilhões avícolas, particularmente naqueles em que o manejo e a biossegurança são muito deficientes. (Yazwinski & Tucker 2008).

As espécies de Nemátodes mais importantes na avicultura, principalmente em aves de produção de carne, são *Ascaridia galli*, *Heterakis gallinarum* e *Capillaria* spp. (Quadro 2), facto verificado na pesquisa parasitológica laboratorial, nomeadamente a partir dos testes de flutuação fecal para a pesquisa de ovos de parasitas (Fig. 4.c-e). Já as poedeiras comerciais alojadas em jaulas raramente apresentam parasitas sem hospedeiros intermediários, em virtude destas aves não terem contacto com o solo.

Espécie	Descrição	Ciclo de Vida	Zona de infecção	Lesões/ Sinais Clínicos
<i>Ascaridia galli</i>	Nemátodes grandes, grossos, branco-amarelados	Direto; ovos ingeridos por insetos podem infetar	Lúmen do intestino delgado	Perda de peso, perda de sangue e possível obstrução intestinal
<i>Heterakis gallinarum</i>	Nemátodes pequenos, brancos, com comprimento até 15 mm	Direto; ovos ingeridos por insetos podem infetar	Ceco	Nódulos, espessamento e inflamação marcada da parede do ceco. É um vetor do protozoário <i>Histomonas meleagridis</i>
<i>Capillaria spp.</i>	Nemátodes com 6-25 mm de comprimento	Direto ou indireto, sendo a minhoca hospedeiro intermediário	Mucosa do intestino delgado e ceco	Intestino superior espessado, com exsudato catarral; emaciação, diarreia, enterite hemorrágica

Quadro 2 – Características das espécies de Nemátodes mais comuns em avicultura. **Adaptado de Bermudez et al. 2006^c**

3.2. Coccídias

A coccidiose em galinhas e perus é causada por espécies protozoárias pertencentes ao Género *Eimeria*. Apesar de existirem muitas espécies neste Género, nem todas são patogénicas. Para além disso, as diferentes coccídias são hospedeiro-específico e, por isso, não afetam as várias classes de aves comerciais.

A coccidiose é encontrada em todos os segmentos da indústria avícola e tem uma distribuição mundial (Bermudez et al. 2006^d). O desenvolvimento na indústria avícola de sistemas de elevada densidade em confinamento aumentou bastante a exposição a esta patologia, em virtude das coccídias terem um ciclo de vida direto e curto (Bermudez et al. 2006^d; McDougald 2008). Estes protozoários multiplicam-se no trato intestinal das aves, causando danos nos tecidos, afetando conseqüentemente os processos digestivos, diminuindo a absorção de nutrientes, assim como desidratação, perda de sangue, perda da pigmentação na pele e aumento da suscetibilidade a outras patologias (McDougald 2008).

Para se obter um diagnóstico e identificação das espécies pode-se analisar o oocisto - um zigoto de parede espessada - excretado na matéria fecal pelo hospedeiro infetado e que é relativamente característico (Fig. 5) (McDougald & Fitz-Coy 2008). Já o diagnóstico rigoroso de coccidiose apresenta-se como uma tarefa difícil para o médico veterinário, uma vez que: 1) há uma sobreposição das zonas intestinais parasitadas pelas diferentes espécies; 2) as lesões macroscópicas alteram-se com a progressão da infecção durante o ciclo de vida; 3) o estado geral de diferentes aves do bando, pode fazer variar com o progresso da doença (algumas apresentam-se em fases agudas, outras em convalescença e ainda outras permanecem não expostas), contudo o diagnóstico e conseqüentes recomendações são exigidos para a totalidade do bando; 4) devem ser feitas distinções entre a verdadeira coccidiose clínica (que requer tratamento) e coccidiose subclínica (moderada) caracterizada por apresentar baixo número de lesões ou oocistos (McDougald & Reid 1991).

3.3. Técnicas laboratoriais de diagnóstico

3.3.1. Exame coproparasitológico

O exame coproparasitológico é, provavelmente, o procedimento laboratorial mais utilizado na prática médico-veterinária para o diagnóstico de doenças parasitárias, uma vez que é económico, não invasivo e proporciona informação preciosa (Zajac *et al.* 2012).

Durante o trabalho de rotina eram utilizadas duas técnicas parasitológicas: um teste qualitativo, o teste de flutuação, para avaliar a presença ou ausência de ovos de parasitas nas fezes e um teste quantitativo, o teste de McMaster, para avaliar o número de ovos de parasitas por cada g de fezes. Este último era usado, sobretudo, para a contagem de oocistos de *Eimeria* spp. em bandos de reprodutores.

3.3.1.1. Teste de flutuação (teste qualitativo)

A flutuação fecal é baseada no princípio segundo o qual o material parasitário presente nas fezes é menos denso do que o líquido de flutuação usado como meio e, por isso, vai flutuar na superfície, podendo ser colhido para avaliação microscópica (Taylor *et al.* 2007). Este processo poderá ocorrer, quer deixando a mistura a repousar por um período de tempo específico, quer por centrifugação da mistura. Contudo a centrifugação permite uma flutuação mais rápida e eficiente, independentemente da solução de flutuação utilizada (Zajac *et al.* 2012).

As soluções de flutuação usadas mais frequentemente incluem soluções açucaradas e salinas, limitadas para valores de gravidade específica aproximadamente entre 1,18 e 1,33. Não há soluções de flutuação perfeitas para todos os parasitas, devendo ser consideradas as vantagens e desvantagens de cada uma na escolha da solução, aquando a realização da análise (Zajac *et al.* 2012). No meu estágio, a solução utilizada era a de Sulfato de Zinco 33%.

Para se realizar um teste de flutuação, começa-se por colocar cerca de 3 g de fezes a analisar num almofariz e adicionam-se cerca de 30 ml de solução de flutuação. Homogeneiza-se a mistura com o pilão e, com a ajuda de um funil, verte-se a mistura para um tubo fazendo-a passar por um coador. Coloca-se o tubo na centrifugadora e a mistura é centrifugada durante 4 minutos a 4000 rpm. Retira-se o tubo da centrifugadora e, com uma ansa, colhe-se solução da superfície da mistura e transfere-se uma gota do líquido aderente para uma lâmina de microscópio. Cobre-se a lâmina de microscópio com uma lamela e observa-se ao microscópio, recorrendo-se à objetiva de 10x para uma análise geral da lâmina e mudando para a objetiva de 40x para uma análise pormenorizada de estruturas.

3.3.1.2. Teste de McMaster (teste quantitativo)

As técnicas de contagem de ovos, que também são técnicas de flutuação, são recomendadas para avaliar a extensão da contaminação de ovos de parasitas nas pastagens frequentadas por animais infetados ou, então, para determinar a eficácia de um tratamento farmacológico (Zajac *et al.* 2012). A contagem de ovos apresenta um valor limitado quando se tenta avaliar o estado clínico do animal individual, uma vez que muitos fatores afetam a produção de ovos, nomeadamente as espécies de parasitas, a imunidade individual do hospedeiro e estágio de infeção. Adicionalmente, contagens efetuadas em amostras combinadas de vários animais poderão não refletir de forma precisa o parasitismo presente na unidade de produção (Taylor *et al.* 2007).

Durante o estágio, a técnica utilizada para a avaliação parasitológica quantitativa era o teste de McMaster. É um teste fácil de se realizar, que requer a utilização de lâminas específicas (Fig. 7). Como solução de flutuação, recorreu-se a uma solução salina saturada, constituída por monidrato de glucose e cloreto de sódio.

Para se proceder ao Teste de McMaster, começa-se por colocar 4 g de fezes num almofariz e adicionam-se cerca de 56 ml de solução de flutuação de forma a perfazer 60 ml. Homogeneiza-se a mistura, recorrendo-se a um pilão e deixa-se repousar durante 1 hora. Com uma pipeta de Pasteur aspira-se o sobrenadante e enchem-se as câmaras da lâmina, preenchendo-as completamente e não permitindo a formação de bolhas. Deixa-se a lâmina repousar 5 minutos antes da observação ao microscópio. Seguidamente observa-se a lâmina ao microscópio utilizando a objetiva de 10x e focando as linhas da câmara que constituem a grelha. Contam-se ovos, oocistos e qualquer outro tipo de parasitas em diferentes estádios em cada faixa de ambas câmaras. Cada tipo de parasita deve ser contado de separadamente.

O cálculo do número de ovos por grama de fezes (epg, *eggs per gram*) é realizado através da fórmula, $epg = \frac{n.(T/V)}{F}$, onde n é a soma do número de ovos contados em ambas as câmaras, T o volume total da mistura de fezes e solução de flutuação (60 ml), V o volume de solução depositado nas câmaras (0,15 ml em cada) e F a quantidade (massa) de fezes (4 g) (Zajac *et al.* 2012).

3.3.2. Estudo parasitológico durante a necrópsia

Durante uma necrópsia, a pesquisa parasitológica começa ainda no exame externo, quando se observam as penas e a pele da ave na tentativa de encontrar ectoparasitas ou os seus ovos.

Após a abertura da cavidade tóraco-abdominal, um estudo mais profundo das alterações a nível intestinal exige a realização de um exame parasitológico. Numa primeira abordagem deve ser realizado um exame externo à serosa do órgão na tentativa de procurar lesões puntiformes com tonalidades variáveis entre o vermelho brilhante e o castanho ou branco. Estas lesões podem ser características de infeção por coccídias (Conway & McKenzie 2007).

Quando o intestino é aberto com a ajuda do enterótomo deve-se avaliar a presença de parasitas adultos, assim como avaliar a parede intestinal, procurando-se anomalias como espessamento da parede, petéquias, necrose, pontos esbranquiçados e hemorragias. Após a remoção do conteúdo intestinal, as áreas suspeitas devem ser raspadas, com o auxílio de uma lâmina de bisturi, e o material colhido colocado numa lâmina de microscópio para posterior análise. O material depositado na lâmina deve ser diluído com algumas gotas de uma solução salina e espalhado com a ajuda de uma lamela (Conway & McKenzie 2007).

Caso não haja lesões suspeitas, deve-se realizar um exame completo com cinco ou mais raspagens ao longo do intestino: 1) zona do duodeno, um ou dois centímetros acima da entrada do ducto biliar; 2) zona média do intestino, onde podemos encontrar o divertículo do saco vitelino; 3) área baixa do intestino, alguns centímetros acima da união com as bolsas cecais; 4) zona média do ceco; 5) zona rectal (Long & Reid 1982).

4. Virologia

A virologia apresenta-se como uma área de extrema importância na patologia de populações. Muitas das patologias de origem viral não matam o hospedeiro, mas o hospedeiro pode servir como um reservatório do vírus e disseminar o vírus para outros animais com que contacta (Hirsh *et al.* 2004).

4.1. Amostras para isolamento viral

Os tecidos para o isolamento viral devem, sempre que possível, serem colhidos de animais ocisados recentemente. Tecidos extensivamente autolisados, ou insuficientemente acondicionados no transporte, geralmente não apresentam vírus infecciosos devido à suscetibilidade da maioria dos vírus a condições ambientais perniciosas (Hirsh *et al.* 2004). Na escolha de amostras deve-se ter em conta o tipo de patologia, a idade e espécie do hospedeiro e a natureza das lesões dos animais afetados. As amostras rececionadas na clínica para processamento, dependendo do tipo de patologia, variavam entre excreções ou secreções, líquidos corporais, zaragatoas de orifícios corporais e tecidos colhidos para biópsia.

4.2. Multiplicação e isolamento viral em ovos de galinha embrionados

Apesar de ser uma técnica clássica, a multiplicação e isolamento viral em ovos de galinha embrionados apresenta-se ainda como uma ferramenta importante no diagnóstico de rotina. O facto de grande percentagem das amostras recebidas serem zaragatoas, e por isso com baixas cargas virais, aliado ao facto de o veterinário de campo muitas vezes querer o isolamento do vírus vivo para desenvolver uma autovacina, faz com que a multiplicação e isolamento em ovos de galinha embrionados tenha, ainda hoje, o seu espaço no laboratório (Leland & Landry 2010).

Para se realizar esta técnica utilizam-se ovos SPF. A inoculação só ocorre quando os embriões alcançam uma idade entre 8 e 11 dias. Uma chave para o sucesso no isolamento viral em ovos embrionados é a via de inoculação (Fig. 7) (Hirsh *et al.* 2004). Dependendo do vírus, podem ser inoculadas as cavidades alantóica ou amniótica, ou ainda a membrana corioalantóica (Quadro 3) (Leland & Landry 2010).

Via de inoculação	Vírus isolados de espécimes clínicos
Cavidades amniótica e/ou alantóica	Vírus Influenza; Vírus da Bronquite Infecciosa (IBV)
Membrana corioalantóica	Herpesvírus; Poxvírus

Quadro 3 – Vias de inoculação, em ovos embrionados, de acordo com o vírus a ser isolado.

Durante a minha atividade prática, as inoculações que realizei tinham como alvo:

- i. Cavidade alantóica: numa primeira fase, colocam-se os ovos no ovoscópio para se detetarem a câmara-de-ar e o embrião. Delineia-se na casca a área referente à câmara-de-ar, desinfetando-se esta com uma solução iodada. Seguidamente faz-se um pequeno orifício na casca no centro da área delineada, recorrendo-se para isso a um aparelho apropriado. A agulha da seringa com o inóculo entra então pelo orifício,

penetra quer a membrana externa, quer a membrana interna, e o inóculo é injetado na cavidade alantóica. Por fim, o orifício é coberto com cera.

- ii. Membrana corioalantóica: os ovos são analisados no ovoscópio e assinala-se uma zona pouco vascularizada. Depois fazem-se duas perfurações na casca do ovo: primeiro, um pequeno orifício na base do ovo, na zona da câmara-de-ar; segundo, com muito cuidado para não se atingir a membrana corioalantóica, abre-se uma “janela” de formato triangular, na zona previamente assinalada, após desinfecção da mesma com solução iodada. De seguida, é aplicada sucção no orifício da base do ovo, retirando-se ar. Então, há um abalamento da membrana corioalantóica, entrando ar pela “janela” e formando-se aí uma câmara. O inóculo é aí depositado. Finalmente fecha-se o orifício da base do ovo com cera (Fig. 8).

Após a inoculação dos ovos, estes são incubados por 3 dias, a uma temperatura de 37 °C e humidade relativa entre 55-60 %. Os ovos devem ser avaliados no ovoscópio a cada 24 horas pois, dependendo do vírus, pode ocorrer a morte dos embriões. Os embriões viáveis apresentam-se com maior tamanho, mais atividade e a rede de vasos sanguíneos é bem visível, ao contrário dos embriões mortos que não se movem e os cujos vasos sanguíneos podem não ser visíveis (Fig. 9). Contudo, deve-se ter em conta que a morte de embriões nas primeiras 24 horas é justificada como traumática, devido à inoculação (Hirsh *et al.* 2004). Os embriões que se encontram vivos às 72 horas são colocados a 4°C durante 2 horas, quer para serem ocidados, quer para com a vasoconstrição se evitem hemorragias. Seguidamente, com a ajuda de tesoura, pinça e lâmina de bisturi, abre-se a casca do ovo e colhe-se, de forma asséptica, líquido alantóide ou membrana corioalantóica, dependendo da via de inoculação usada. Estas amostras devem ser homogeneizadas numa solução salina estéril à temperatura ambiente, para se obter novamente um inóculo. Deve-se repetir o procedimento até se completar três passagens em ovos embrionados. Após a última passagem, realiza-se exame visual dos embriões e das membranas do ovo e, caso os embriões se encontrem atrofiados, deformados, edematosos ou hemorrágicos, ou quando as membranas apresentem lesões, são colhidas amostras para PCR, com o objetivo de confirmar a presença do ácido nucléico viral (Fig. 10).

4.3. Polymerase Chain Reaction

O desenvolvimento, relativamente recente, do PCR revolucionou o diagnóstico rápido de várias doenças virais. A importância deste procedimento reside na sua capacidade de amplificar pequenas quantidades de ADN ou ARN viral e na sua capacidade de ser realizado em larga escala, para que um vasto número de amostras pode ser avaliado simultaneamente. Para além disso, desenvolvimentos técnicos como o *real-time* PCR permitem uma quantificação da carga viral na amostra. Resumidamente, o PCR é um ensaio baseado na síntese cíclica de um segmento de ADN, limitado por dois oligonucleótidos específicos, que são usados como *primers* para amplificar porções de interesse do genoma viral (Fig. 11) (Hirsh *et al.* 2004).

Quando propriamente realizado, o PCR é sensível e específico, mas se não for associado a outros dados, a identificação do ácido nucléico viral não prova que a infeção esteja presente (Hirsh *et al.* 2004). Da mesma forma, a multiplicação e isolamento virais a partir de um animal

não implicam que o vírus seja o agente causal de qualquer patologia que está a decorrer naquele animal. É, por isso, importante enfatizar que os dados fornecidos por estes dois métodos, quando isolados, podem não ser suficientes para um diagnóstico final.

Finalmente deve-se ter em conta que as estirpes vacinais de vírus podem ser isoladas de animais vacinados e podem ser confundidas com as estirpes de campo.

5. Anatomia patológica

5.1. Procedimentos de diagnóstico anátomo-patológico

Existem vários procedimentos de diagnóstico e necrópsia, podendo as técnicas e os instrumentos utilizados variar de patologista para patologista. O principal objetivo da necrópsia é determinar a causa de uma performance débil, de uma patologia, ou de mortalidade, examinando órgãos e estruturas, procurando obter os melhores materiais biológicos possíveis para levar a cabo testes sorológicos, microbiológicos, histopatológicos, etc (Bermudez & Stewart-Brown 2008).

5.2. História

O patologista que não viu a unidade de produção ou o bando, antes de tentar diagnosticar o problema e aplicar medidas corretivas, encontra-se em séria desvantagem. Isto pode ser parcialmente ultrapassado se se conseguir aceder a uma boa história da doença. Quanta mais informação o patologista obtiver acerca dos animais, do manejo e do ambiente, mais facilmente podem determinar soluções para os problemas (Bermudez & Stewart-Brown 2008).

5.3. Exame externo

Um exame externo deve ser realizado para a pesquisa de tumores, abcessos, alterações na pele, bico, lesões de canibalismo, traumatismos, sinais de desidratação, diarreia, descargas respiratórias e nasais, exsudados da conjuntiva, condição das penas e crista, e a condição corporal (Bermudez & Stewart-Brown 2008). É importante ter atenção particular para anomalias na articulação tibiotársica, nas bainhas tendinosas, olhos e boca. Deve-se, ainda, pesquisar sinais ou a presença de parasitas externos (Bermudez *et al.* 2006⁶).

5.4. Técnica de necrópsia

Com a ave assente dorsalmente sobre a mesa de necrópsia molham-se as penas com um pouco de água e sabão. Seguidamente, com uma tesoura, corta-se a pele solta entre a superfície medial de cada perna e o abdómen. Então, agarra-se firmemente na área do fémur e procede-se à desarticulação coxofemoral de modo a que os membros fiquem apoiados na mesa. Realiza-se um corte na pele, entre os dois cortes anteriores, num ponto entre a quilha e a cloaca, rebatendo-se de seguida a pele cranialmente, expondo os músculos peitorais.

Para se proceder à abertura da cavidade tóraco-abdominal, faz-se primeiro uma incisão transversal na parede abdominal, entre a quilha e a cloaca. De seguida realiza-se uma incisão longitudinal, contornando os músculos peitorais pelas junções intercostais. Utiliza-se um

osteótomo para cortar a caixa torácica, assim como o coracóide e clavícula de ambos os lados. O esterno e os músculos peitorais podem, então, ser rebatidos cranialmente, ficando os órgãos visíveis e acessíveis ao exame e eventual remoção.

Os sacos aéreos são examinados *in situ*. O coração é removido e examinado. Seguidamente o fígado e o baço são removidos para análise. Os pulmões são removidos utilizando-se uma pinça invertida que vai incisar lateralmente e “descolar” os pulmões da caixa torácica.

Para remover o trato gastrointestinal, secciona-se o esófago no bordo cranial do proventrículo e reflete-se todo o trato caudalmente, cortando as ligações mesentéricas. Proceder-se posteriormente então à abertura do trato gastrointestinal, com a ajuda de um enterótomo, incisando longitudinalmente ao longo do proventrículo, moela, intestino delgado, ceco e reto. A moela é então separada do duodeno e o seu conteúdo é lavado. Examina-se o conteúdo do trato gastrointestinal pesquisando lesões e parasitas. A bursa de Fabricius deve, também, ser removida e avaliada.

Os órgãos sexuais também devem ser alvo de avaliação. Nas fêmeas os ovários e oviduto devem ser removidos, sendo este último aberto longitudinalmente. Os rins e os ureteres devem ser avaliados *in situ* e, apenas se houver indicação, devem ser removidos para uma avaliação mais cuidadosa.

Quer o plexo braquial, quer o plexo ciático podem ser examinados. O primeiro é facilmente avaliado cranialmente à primeira costela, ao passo que o segundo se encontra dorsalmente aos rins, pelo que a sua avaliação passa por uma remoção dos rins. O nervo ciático também pode ser avaliado, sendo exposto após uma separação cuidadosa dos músculos adutores.

Para um estudo da cavidade oral e estruturas superiores, corta-se com uma tesoura a comissura lateral do bico, prolongando-se o corte da pele até à entrada torácica. Realiza-se também um corte longitudinal no esófago e papo, avaliando-se o seu conteúdo e cheiro. Seguidamente procede-se à avaliação das estruturas respiratórias, seccionando-se longitudinalmente a laringe e a traqueia. Com uma tesoura, corta-se o bico superior, perto dos olhos, para avaliar a cavidade nasal e expor seio infra orbital. Para avaliar o seio, procede-se ao corte longitudinal da sua parede lateral, recorrendo-se a uma lâmina de bisturi.

Para remoção e avaliação do cérebro, procede-se primeiro a uma separação da cabeça do resto do corpo pela articulação atlanto-occipital, removendo-se ainda a mandíbula inferior. De seguida, realiza-se um corte na pele da zona caudal, sendo esta refletida rostralmente por cima do crânio e da mandíbula superior. Com tesouras apropriadas, cortam-se as paredes ósseas da cavidade cranial em ambos os lados, começando-se no forâmen occipital e prosseguindo-se lateralmente em direção rostral. Seguidamente eleva-se a porção óssea cortada de forma muito cuidadosa, expondo-se assim o cérebro.

5.5. Casos clínicos

5.5.1. Coliseticémia em galinhas poedeiras

História: Um veterinário enviou para a clínica duas galinhas poedeiras, já eutanasiadas, provenientes de um pavilhão com cerca de 10.000, relatando existir uma diminuição na

postura, um aumento na mortalidade e diarreia. Na base destes problemas estará um agente que o veterinário pede para isolar para posteriormente se desenvolver uma vacina autóloga.

Necrópsia: A partir de uma análise externa detetaram-se sinais de diarreia, pois os animais apresentavam cloaca e penas à volta muito sujas. O peso dos animais foi registado, pesando um 2,08 kg e outro 1,78 Kg. Procedeu-se à necrópsia dos animais. Após a abertura da cavidade tóraco-abdominal, foram observadas alterações em vários órgãos, nomeadamente hepatomegalia com congestão, perihepatite, pericardite, salpingite e ooforite. O oviduto encontrava-se distendido e foram encontradas massas caseosas no seu conteúdo (Fig. 12). Dentro do oviduto encontrava-se um ovo formado e, tendo-se partido a casca para analisar o seu conteúdo, constatou-se que este se encontrava aquoso.

Diagnóstico diferencial: Colibacilose, pasteurelose, salmonelose, estreptococose.

Colheita de amostras: a) realizou-se uma cultura bacteriológica de rotina: plaqueamento direto do coração, fígado e duodeno em agar sangue (COS), McConkey e Coliforme agar, e ainda plaqueamento direto do duodeno em SCS agar e SGC2 agar;

Resultados: Crescimento de colónias compatíveis com *Escherichia coli* (Fig. 13).

Diagnóstico: Coliseticémia.

Discussão: A colibacilose é a doença infecciosa de origem bacteriana causada por *Escherichia coli* mais comum em avicultura, podendo ser localizada ou sistémica. Esta bactéria pertence à Família das *Enterobacteriaceae*, um conjunto de bactérias fermentadoras de glucose, oxidase negativas, que podem crescer aerobiamente ou anaerobiamente na presença de sais biliares, e que utilizam fontes de nitrogénio e carbono simples (Barnes *et al.* 2008). Os vários serótipos de *E. coli* são habitantes normais do trato intestinal, encontrando-se em elevado número na maioria dos animais de sangue quente. A sua presença no trato intestinal inferior é benéfica, contribuindo para a inibição de outras bactérias incluindo a *Salmonella* spp. (Barnes *et al.* 2008).

A colibacilose é geralmente secundária a outros agentes infecciosos e fatores não infecciosos, que diminuem as defesas do hospedeiro, podendo também ser causada por estirpes virulentas de *E. coli* (Barnes *et al.* 2008). Em avicultura, há vários tipos de colibacilose, localizados e sistémicos, sendo o caso descrito correspondente a uma infeção sistémica em virtude da co-existência de uma salpingoperitonite, ooforite, pericardite e perihepatite. A salpingite e a ooforite em galinhas poedeiras surgem normalmente devido à ascensão de *E. coli* pelo oviduto a partir da cloaca. A produção intensiva de ovos e a atividade estrogénica associada provocam um relaxamento do esfíncter entre vagina e cloaca, predispondo as poedeiras a uma infeção do trato reprodutor (Barnes *et al.* 2008). Em casos crónicos, o oviduto pode encontrar-se marcadamente distendido, apresentando uma parede fina e massas, múltiplas ou singulares, de exsudado caseoso que preenchem o órgão (Barnes *et al.* 2008). A propagação do microrganismo para a cavidade corporal através da parede do oviduto danificada leva a uma peritonite concorrente que, por já existir uma salpingite, é renomeada salpingoperitonite. Quando a estirpe virulenta de *E. coli* entra na corrente sanguínea, desenvolve-se um quadro septicémico no qual a perihepatite e a pericardite são achados

comuns (Barnes *et al.* 2008). Aquando da abertura do saco pericárdico é possível observar-se um exsudado viscoso a caseoso que pode aderir de forma frouxa ao epicárdio. Com a progressão da patologia, o exsudado aumenta, torna-se mais fibrino-heterofílico e surgem massas caseosas. Nos casos crónicos há uma adesão do saco pericárdico ao epicárdio (Barnes *et al.* 2008).

Geralmente, as aves com colisetiemia encontram-se moribundas, não responsivas a estímulos e são facilmente capturadas e manipuladas. Estas aves permanecem imóveis, com os olhos fechados, numa posição curvada, com a cabeça e o pescoço caídos (Barnes *et al.* 2008). O consumo de alimento e água diminui contribuindo assim para um agravamento do prognóstico. A desidratação pode ser indicada pela pele que se encontra seca e escurecida, particularmente nas zonas da perna e patas. Apesar de tecnicamente não ser um sinal clínico, a taxa de mortalidade pode ser indicadora de um surto de colibacilose no bando. Nestes casos a mortalidade cumulativa pode ascender a 10 % e manter-se elevada entre 3 a 10 semanas. Um outro dado importante é, também, a queda da produção de ovos (Barnes *et al.* 2008).

Para diminuir os casos de colibacilose é preciso adotar algumas medidas preventivas. A transmissão de *E. coli* patogénica através dos ovos é a forma mais importante de transmissão entre bandos e responsável por uma mortalidade elevada nos pintos (Barnes *et al.* 2008). Deste modo é importante adotar medidas que diminuam a contaminação da casca dos ovos postos recentemente: é importante recolher os ovos com frequência bidária, não incubar “ovos do chão”, descartar ovos partidos ou aqueles com óbvia contaminação fecal (Barnes *et al.* 2008). Os ovos devem ser desinfetados antes do armazenamento e devem ser armazenados sob condições ideais. Para além disso, devem ser realizados procedimentos adequados com vista uma higienização escrupulosa da incubadora. As bactérias coliformes podem também ser encontradas na cama e na matéria fecal. O pó nos pavilhões avícolas pode conter $10^5 - 10^6$ UFC de *E. coli*/g, podendo estas bactérias persistir por longos períodos e devendo, assim, o pó dos pavilhões ser controlado. Também as fezes de roedores contém coliformes patogénicos (Barnes *et al.* 2008). Deste modo é importante implementar um plano vigoroso de higienização, assim como diminuir o mais possível os fatores de stress, as doenças intercorrentes e o parasitismo (Bermudez *et al.* 2006^a). Ainda, uma outra fonte potencial de introdução de novos serótipos no bando é o alimento composto que muitas vezes se encontra contaminada com coliformes patogénicos (Barnes *et al.* 2008). É importante fornecer às aves apenas alimento composto livre de contaminação fecal. Também na água se pode encontrar serótipos patogénicos (Barnes *et al.* 2008).

Na base do tratamento da colibacilose está o recurso farmacológico a muitos antibióticos como tetraciclina, neomicina e sulfas entre outros. Deve-se realizar o antibiograma e o tratamento deve ser administrado o mais cedo possível para maior eficácia (Bermudez *et al.* 2006^a).

5.5.2. Parasitismo por *Amidostomum anseris* e amiloidose

História: Foram enviados três gansos vivos, provenientes de um bando de reprodutores, cuja história médica relatava que, naquele bando, muitos dos gansos apresentavam o pénis prolapsado e, por mais que o revertissem, ele prolapsava novamente. O pénis prolapsado era, assim, alvo das bicadas dos outros animais, tornando-se inflamado e, em alguns casos, necrótico. Para além disso, no mesmo bando, os animais apresentavam sinais de diarreia.

Necrópsia: Ao exame externo verificou-se que os animais se encontravam deprimidos, com a cloaca e penas à volta sujas e com o pénis prolapsado, necrótico e de consistência muito dura (Fig. 14). Procedeu-se à eutanásia dos animais, administrando-se tiopental por via intravenosa, para de seguida se realizar a necrópsia. Aquando a abertura da cavidade tóraco-abdominal observou-se apenas num dos animais alteração do fígado, encontrando-se este aumentado, com uma cor pálida e com uma consistência firme. Ao corte a cápsula encontra-se espessada e as superfícies de corte apresentavam um aspeto ceroso liso (Fig. 16.a). Encontraram-se alterações adicionais nos três animais quando se procedeu à abertura do trato digestivo. Quer o intestino, quer a moela não apresentavam alimento e, nesta última, foram encontrados achados diferentes: num animal a moela apresentava-se com pequenos pontos hemorrágicos na cutícula; num outro animal era possível observar pequenas larvas na cutícula; no último animal a moela apresentava-se em muito mau estado, estando a cutícula necrosada, laxa e solta (Fig. 15.a-c).

Diagnóstico diferencial: Parasitismo interno, micotoxicose, amiloidose.

Colheita de amostras: a) foram colhidas larvas, da cutícula da moela, para uma lâmina e cobertas com uma lamela para serem observadas ao microscópio; b) para histologia, foram colhidas amostras de fígado alterado.

Resultados: a) observaram-se larvas de nemátodes *Amidostomum anseris* (Fig. 15.d-f); b) alterações compatíveis com Amiloidose: presença de material eosinofílico, amorfo a substituir hepatócitos, encontrando-se apenas um pequeno conjunto de hepatócitos reconhecidos (Fig. 16.b).

Diagnóstico: Parasitismo por *Amidostomum anseris* com amiloidose consequente.

Discussão: *Amidostomum anseris* é um nemátode que tem sido documentado em patos, gansos e pombos, encontrando-se geralmente na cutícula da moela. Morfologicamente é um parasita avermelhado, delgado, com uma cápsula bucal curta que apresenta três dentes apontados à sua base. O seu ciclo de vida é direto, sendo os seus ovos passados nas fezes num estado parcialmente desenvolvido. As aves suscetíveis infetam-se ao ingerirem comida ou água contaminadas com larvas (Yazwinski & Tucker 2008).

Atribui-se a este nemátode grande perdas entre gansos. As aves novas apresentam-se com anorexia, deprimidas e emaciadas. A cutícula da moela de uma ave altamente parasitada aparece necrosada, enfraquecida e, por vezes, solta em algumas zonas. A infestação pode, ainda, ser acompanhada por perda de sangue (Yazwinski & Tucker 2008).

As lesões macroscópicas encontradas neste caso são compatíveis com um quadro de parasitismo crónico no bando suscetível de os sinais clínicos encontrados no bando, em virtude de ao provocar um excesso de peristaltismo intestinal, potenciar um prolapso peniano e diarreia.

O parasitismo crónico permite ainda explicar a presença de amiloidose, uma vez que esta desordem patológica ocorre secundariamente a processos inflamatórios crónicos (Abdul-Aziz *et al.* 2008). A amiloidose caracteriza-se por uma deposição de material proteináceo, eosinofílico, fibrilar ou homogéneo, similar à hialina, entre células em vários tecidos e órgãos

(Crespo & Shivaprasad 2008; Abdul-Aziz *et al.* 2008). Nas aves, a forma de amilóide conhecida é a amilóide A. Esta é derivada de uma proteína reativa de fase aguda – SAA (*serum amyloid A*) – que é sintetizada no fígado. A SAA é produzida em excesso em resposta a estimulação antigénica crónica. Geralmente a SAA é completamente degradada, mas na amiloidose há um catabolismo incompleto de um fragmento insolúvel da proteína associada a amilóide (amilóide A) (Abdul-Aziz *et al.* 2008).

Não há sinais específicos associados à amiloidose e usualmente os animais que padecem da patologia apenas são submetidos à necrópsia depois de serem encontrados mortos (Crespo & Shivaprasad 2008).

Os depósitos de amilóide podem ser encontrados em vários tecidos, constando entre os órgãos mais frequentemente afetados o fígado, o baço, o intestino e os rins. As lesões macroscópicas podem variar entre ausentes ou mínimas, quando os depósitos se encontram em baixas quantidades. Contudo, em quantidades significativas, as lesões macroscópicas mais frequentes consistem em ascite, fígado aumentado de tamanho com consistência firme (por vezes semelhante a borracha) com superfície lisa, pálida ou castanha ou cinzenta (Crespo & Shivaprasad 2008). Ao corte, a superfície do fígado pode-se encontrar lisa, cerosa e com a cápsula espessada devido a fibrose (Crespo & Shivaprasad 2008). Os depósitos extracelulares de amilóide no fígado causam compressão, atrofia e oclusão dos hepatócitos que, em casos severos, pode conduzir a insuficiência hepática. A coloração diferencial usada na histologia para amiloidose é a coloração de vermelho do congo, contudo, em aves, o amilóide não fica corado de forma consistente (Abdul-Aziz *et al.* 2008).

Não há tratamento para a amiloidose, apenas medidas preventivas que visam reduzir a incidência de infeções crónicas e o stress desencadeadores da patologia.

5.5.3. Varíola aviária (forma cutânea)

História: Foi enviada para a clínica uma galinha poedeira, já ocisada, proveniente de um bando com 30 semanas de idade que, segundo o veterinário, apresenta uma quebra na postura de 3 %, sem que a mortalidade tenha aumentado. O veterinário destaca o aparecimento de diferentes lesões na cabeça de alguns animais, que variam entre massas nodulares à volta dos olhos, cabeça inchada e olhos salientes.

Necrópsia: Realizou-se um exame externo onde se pôde constatar que o animal se apresentava magro, com um peso de 1,17 kg. Para além, disso apresentava várias alterações, todas concentradas: zona periorbital tumefacta, olhos salientes, conjuntivite bastante avançada no olho esquerdo, conjuntivite moderada no olho direito, pálpebras com lesões e consistência nodular, lesão cicatrizada no barbilhão esquerdo (Fig.17.a). Seguidamente procedeu-se à necrópsia do animal, não se encontrando mais nenhum achado importante para além de uma degenerescência nos ovários.

Diagnóstico diferencial: Coriza infecciosa, micoplasmose, varíola aviária (forma cutânea), laringotraqueíte infecciosa.

Colheita de amostras: a) realizou-se uma cultura bacteriológica de rotina: plaqueamento direto do coração, fígado e duodeno em agar sangue (COS), McConkey e Coliforme agar, e ainda plaqueamento direto do duodeno em SCS agar e SGC2 agar; b) fez-se cultura

bacteriológica do olho: plaqueamento direto em agar sangue (COS), McConkey, Coliforme agar e meio Chocolate (HAEM2); c) colheita de zaragatoa do seio infraorbital para PCR; d) colheita de amostras das lesões nodulares e cicatrizes para exame histológico e PCR.

Resultados: Nenhum resultado expressivo, com exceção da análise da amostra d), onde o exame histológico permitiu visualizar uma hiperplasia severa (acantose) e hipertrofia das células epiteliais, associadas a inclusões intracitoplasmáticas (poxvírus). Para além disso, foram observadas zonas de inflamação, assim como balonamento degenerativo das células com inclusões (Fig.17.b).

Diagnóstico: Variola aviária (forma cutânea)

Discussão: A variola aviária é uma doença viral, de propagação lenta, em galinhas, perus, codornizes, pombos, canários, psitacídeos e outras aves selvagens (Shivaprasad 2008). Apresenta importância económica na avicultura devido à queda de produção de ovos e mortalidade que provoca (Tripathy & Reed 2008). Na base da sua etiologia está o Poxvírus da Família *Poxviridae*, do Género *Avipoxvirus* e que contém várias estirpes (Shivaprasad 2008).

As infeções por poxvírus ocorrem através de transmissão mecânica do vírus para áreas lesadas ou laceradas da pele (Tripathy & Reed 2008). As crostas da pele que contêm o vírus caem, podendo este persistir muito tempo no ambiente e infectar aves suscetíveis (Bermudez *et al.* 2006^b). Num ambiente contaminado, o aerossol gerado pelas penas e pelas crostas secas, que contêm partículas virais, criam também condições favoráveis para infeção do trato respiratório. As células da mucosa do trato respiratório superior e da boca aparentam ser altamente suscetíveis ao vírus, pelo que, aqui, a infeção pode iniciar-se na ausência de trauma ou lesão (Tripathy & Reed 2008).

A variola aviária pode ocorrer numa de duas formas, cutânea ou diftérica, ou ambas. A forma cutânea da doença, geralmente denominada de forma seca e presente no caso descrito, é a forma predominante na maioria dos surtos e é caracterizada pelo aparecimento de lesões na crista, barbilhões, pálpebras e outras áreas corporais sem penas. A lesão característica desta forma da doença é uma hiperplasia epitelial local que envolve epiderme e folículos das penas subjacentes, com a formação de pápulas - nódulos que se apresentam inicialmente como pequenos focos brancos - aumentando rapidamente o seu tamanho e adquirindo uma cor amarelada (pústulas) (Tripathy & Reed 2008; Bermudez *et al.* 2006^b). Ocasionalmente podem surgir pequenas lesões similares a papilomas (Bermudez *et al.* 2006^b). Cerca de duas semanas depois, as lesões apresentam áreas de inflamação na base e tornam-se hemorrágicas. A formação de uma crosta, que poderá durar mais uma ou duas semanas, vê o seu fim com a descamação da camada epitelial degenerada (Tripathy & Reed 2008).

Do ponto de vista microscópico, as lesões são caracterizadas por uma severa hipertrofia e hiperplasia das células epidérmicas, muitas das quais sofrem degenerescência e balonamento, contendo frequentemente corpos de inclusão eosinofílicos intracitoplasmáticos denominados de corpos de Bollinger. As inclusões podem ser bem grandes, frequentemente com vacúolos devido a lípidos e comprimem o núcleo para a periferia. Os corpos de inclusão são patognomónicos para a infeção por poxvírus aviário (Shivaprasad 2008).

Relativamente aos sinais clínicos, inicialmente são graduais e a patologia pode não ser detetável até as lesões cutâneas serem numerosas e óbvias no bando. Lesões cutâneas no

olho vão interferir com a capacidade da ave alcançar comida e água, mas a mortalidade é baixa se a doença não se complicar (Tripathy & Reed 2008). Muitas vezes, as aves apresentam poucos sinais para além de uma redução suave a moderada no crescimento, uma perda temporária da produção de ovos ou uma falta de vitalidade do bando (Bermudez *et al.* 2006^b).

A varíola aviária pode ser prevenida em galinhas, perus e codornizes através de vacinação. A vacinação é geralmente realizada às 4 semanas de idade, mas pode ser realizada a qualquer idade, se necessário. As poedeiras devem ser vacinadas 1 a 2 meses antes do início da produção. Já os broilers não são vacinados, a não ser que hajam casos de varíola na região (Bermudez *et al.* 2006^b).

II. Investigação

Um componente importante, que constitui um alicerce de uma unidade académica, com as características da *Clinic for Avian, Reptile and Fish Medicine*, é o da investigação. Esta lida principalmente com doenças infecciosas entre as várias espécies de aves comerciais e complementa o trabalho de rotina, constituindo um grande pilar no desenvolvimento de novas ferramentas na monitorização, controlo e diagnóstico de agentes patogénicos. É, também, objetivo base de qualquer trabalho científico a melhoria das condições de saúde e bem-estar dos animais sincronizado com o desenvolvimento de estratégias que otimizam o nível de produção. Tudo isto é suplementado com a possibilidade de se usarem animais SPF em condições de isolamento. A combinação das áreas da pecuária e do laboratório permitiu formar uma base para o desenvolvimento de modelos *in vivo* e *in vitro* para o estudo individual da patogénese de doenças.

Durante o período de estágio foi-me dada a oportunidade de participar na componente prática de um trabalho de investigação em curso, que assentou num ensaio clínico para o estudo da bactéria *Gallibacterium anatis* em galinhas poedeiras afetadas com imunossupressão seletiva. Este acompanhamento permitiu-me adquirir competências no âmbito dos procedimentos experimentais por detrás de um ensaio com estas características e envolvendo experimentação animal.

6. Ensaio experimental

6.1. Introdução

Estudos recentes conduziram a uma nova classificação taxonómica de microrganismos anteriormente identificados como *Actinobacillus salpingitidis*, *Pasteurella haemolytica* aviária ou ainda *Pasteurella anatis*, juntando-os num novo Género, *Gallibacterium*, pertencente à Família *Pasteurellaceae* (Christensen *et al.* 2003). O Género *Gallibacterium* apresenta uma espécie, *G. anatis*, caracterizável como um cocobacilo gram negativo, não móvel, encapsulado, beta-hemolítico e que forma colónias redondas, acinzentadas, semi transparentes com diâmetro entre 0,5 e 1 mm (Castellanos 2006). A natureza das infeções por *Gallibacterium anatis* não é completamente conhecida, assim como a sua epidemiologia e interação com o hospedeiro

(Bisgaard 1993). Estes microrganismos têm sido isolados a partir de aves clinicamente saudáveis, nas quais se sugere que constituam uma parte da flora normal do trato respiratório superior, assim como da flora do trato genital inferior (Bisgaard 1977; Mraz *et al.* 1976; Mushin *et al.* 1980). Contudo, outros autores isolaram *Gallibacterium anatis*, em culturas puras, a partir de galinhas com salpingite, ooforite, peritonite, septicemia, pericardite, hepatite e lesões do trato respiratório superior, o que indica que pelo menos algumas estirpes de *Gallibacterium anatis* possuem potencial patogénico (Kjos-Hanssen 1950; Kohlert 1968; Mráz *et al.* 1976; Bisgaard 1977; Matthes and Hanschke 1977; Mushin *et al.* 1980; Bisgaard & Dam 1981; Shaw *et al.* 1990; Mirle *et al.* 1991; Suzuki *et al.* 1996).

O objetivo desenhado para este projecto de investigação foi dar a conhecer uma compreensão básica da interação bactéria-hospedeiro, através de um estudo de infeção controlada, onde se usa uma estirpe de *Gallibacterium anatis*, bem caracterizada, em galinhas poedeiras com diferentes estados imunitários.

6.2. Ovos para incubação

O início da prática experimental começou com a receção de ovos SPF, para incubação, pertencentes a uma linhagem de poedeiras. Os ovos SPF derivam de bandos SPF, ou seja, bandos de galinhas com estado negativo para agentes específicos, transmissíveis verticalmente (Quadro 4 – anexo VI) (European Pharmacopoeia 2010). Contudo, para um bando obter o estatuto de SPF, para além do próprio bando, as duas gerações prévias têm que ser submetidas a um programa de testes para se despistar um conjunto de agentes (European Pharmacopoeia 2010). Apesar de serem negativos para agentes específicos, os ovos SPF não são estéreis, facto que deve estar presente na mente de todos os agentes que usam estes ovos, pois podem estar contaminados com antigénios não controlados (Jungback & Motitschke 2008). A particularidade dos ovos serem SPF é importante pelo cariz do ensaio. O facto de ser um ensaio laboratorial, onde se pretende compreender a ação de um agente, exige que controlemos o maior número de variáveis possíveis que possam interferir com os resultados do mesmo. Com os ovos SPF esse objetivo é alcançado pela ausência de um grupo de agentes patogénicos, conseguindo-se assim estudar isoladamente o agente do ensaio.

Os ovos SPF, antes de incubados, podem ser armazenados a uma temperatura de 19 °C e humidade de 72 %, por um período máximo de uma semana. Os ovos que são mantidos a uma temperatura superior a 21 °C, por longos períodos, potenciam a morte embrionária durante a incubação.

6.3. Incubação

A incubação de ovos dura 21 dias, sendo considerado o dia zero aquele em que se colocam os ovos na incubadora. O período de incubação, consoante os valores de temperatura, humidade e movimento, pode ser dividido em duas fases: uma primeira fase até ao 18º dia de incubação e uma segunda a partir dessa data (Fig. 18). Para além do controlo da temperatura, humidade e movimento, foi também realizado um controlo da viabilidade dos embriões, recorrendo ao ovoscópio, de forma a separarem-se os viáveis dos inviáveis (Fig. 9).

6.3.1. Temperatura

A temperatura de incubação não é apenas importante para um desenvolvimento embrionário normal e eclosão bem sucedida, mas também para boa performance pós-eclosão (Bruggeman *et al.* 2009). É recomendada que a temperatura de incubação seja regulada de acordo com o padrão “natural” de produção de calor do ovo incubado para se obter uma elevada taxa de eclosão e uma boa qualidade dos pintos (Bruggeman *et al.* 2009). A temperatura experienciada pelo embrião durante a incubação é dependente do ar da incubadora, do calor metabólico produzido pelo embrião, do leve efeito de arrefecimento provocado pelas perdas de água do ovo e da eficiência da transferência de calor entre ovo e ar da incubadora (French 2009). Durante o período de incubação o controlo da temperatura foi realizado a partir do termostato da incubadora, mantendo-se um registo diário do seu valor, programado quer na primeira fase, quer na segunda, para 37 °C.

6.3.2. Humidade

Os ovos apresentam cascas porosas para permitirem as trocas gasosas. Para além disso eles também vão perder vapor de água que se vai difundir para fora através da casca. A taxa de perda de água irá depender da humidade da incubadora e da condutância da casca. Este processo é necessário na maioria das espécies aviárias para proporcionar a formação de uma câmara-de-ar que irá permitir a inflação dos pulmões, exatamente antes da eclosão e, também, para se perder a água gerada do metabolismo lipídico (Bruggeman *et al.* 2009). O valor da humidade, aplicado na primeira fase da incubação, é de 60 %, aumentando para 80 % na segunda fase. Tal deve-se ao facto de nos últimos 3 dias os pintos começarem a partir a casca e, para além de uma humidade elevada permitir-lhes partirem a casca com maior facilidade, também lhes permite não desidratarem após a eclosão.

6.3.3. Movimento

O movimento dos ovos tem como principal objetivo permitir um desenvolvimento apropriado do embrião ao impedir que as membranas do ovo se colem ao embrião. Desta forma a incubadora tem movimentos programados, de 4 em 4 horas. Os ovos sofrem uma viragem de 45°. Na segunda fase de incubação os ovos já não são sujeitos a movimento, devido ao facto de nos últimos três dias de incubação os pintos começarem a partir a casca e nascer.

Após o nascimento, os pintos permaneceram um dia dentro da eclosora, antes de serem alojados. Tal deve-se ao facto de os pintos ainda estarem a absorver o saco vitelino abdominalmente não precisando de alimento, do pio dos pintos que nascem primeiro estimularem a eclosão dos outros pintos e também porque se evita a manipulação no primeiro dia, diminuindo-se assim as probabilidades de onfalites.

Aquando da retirada dos pintos da eclosora, é necessário proceder à limpeza e desinfeção da mesma. Para tal removeram-se os ovos onde não houve eclosão, removeram-se cascas e lavou-se muito bem a eclosora. A desinfeção foi feita por fumigação durante um período de 30 minutos, mantendo-se depois a eclosora fechada por 24 horas.

6.4. Alojamento

O alojamento de bandos SPF deve ser feito minimizando-se o risco de contaminações, de forma a controlarem-se o maior número de variáveis que possam interferir com os resultados do estudo (como foi explicado em 6.1) (European Pharmacopoeia 2010). Deste modo, após incubação, os pintos foram transferidos para instalações de isolamento com condições ambientais controladas, contendo seis unidades de isolamento biológico equipadas com filtração de ar e pressão negativa, e que foram aquecidas nas 24 horas prévias. As unidades de isolamento biológico são câmaras (155 x 85 x 75 cm), com portas nos topos e duas janelas de plástico reforçado a fibra de vidro nos lados. Em cada janela existem duas luvas de manipulação que, em caso de não estarem a ser utilizadas, se encontram invertidas para o exterior. No exterior existe um tanque com capacidade de 5 l que se encontra ligado ao bebedouro que existe no interior, servindo para o abastecimento de água potável. No interior existe um comedouro que é abastecido a partir de um alçapão que existe no pavimento da câmara. A sua saída está emersa num pequeno tanque de água. Este sistema permite introduzir itens na câmara e controlar a contaminação (Fig. 19).

Nestas instalações são levadas a cabo medidas apropriadas biossegurança, nomeadamente de prevenção de roedores, aves selvagens e insetos, sendo vedado o acesso a pessoal não autorizado. O pessoal com autorização para entrar nas instalações não deve ter tido contacto com outras aves ou agentes que possam infetar o bando. É aconselhável que usem roupa protetora quando entrarem nas instalações. É ainda aconselhável que todos os utensílios que entrem nas unidades de isolamento sejam, sempre que possível, esterilizados de forma a impedir a introdução de microrganismos.

6.5. Marcação

A marcação foi realizada apenas 2 dias após a eclosão, recorrendo-se a etiquetas numeradas (*necktag*) e utilizando-se uma pistola apropriada para fixá-las na pele da face dorsal do pescoço dos pintos. A marcação é realizada numa idade jovem para se criar um hábito desde logo na ave e, também, para se evitarem hemorragias uma vez que os vasos são ainda muito pequenos. Este tipo de marcação oferece vantagens quando comparada com outras:

- a) anilha na pata – não sobrevive muito tempo pois é alvo de picadas, para além de ter que ser adaptada ao seu crescimento;
- b) etiqueta na asa – não é prática para uma manipulação dentro de câmaras isoladores pois o número não é visível;
- c) mancha colorida no pescoço – também não dura muito pois é alvo de picadas pelos outros animais, catalisando comportamentos de canibalismo.

6.6. Maneio

Tendo em conta que o ensaio iria apenas durar 8 semanas e que nem todas as aves iam chegar até às 8 semanas (80% das aves iam ser ocisadas antes das 8 semanas), o maneio realizado foi bastante simples. Quer a água, quer o alimento composto foram fornecidos *ad libitum*, durante o estudo. O período de iluminação, com exceção do primeiro dia que foi de 24 horas de luz, foi de 16 horas de luz e 8 de escuridão (16 horas de luz na sala,

mas 8 horas de luz dentro das câmaras). A temperatura no interior das câmaras era inicialmente de 34 °C, baixando gradualmente até aos 28 °C no final do ensaio.

Foram mantidos e atualizados registos relativamente a qualquer alteração dos valores acima mencionados, assim como consumo de alimento composto ou de água.

6.7. Procedimentos experimentais

Como referido anteriormente, as aves foram divididas por 6 câmaras de isolamento que correspondem a seis grupos distintos. Destes seis grupos, quatro constituíram os grupos de estudo, sendo dois os grupos de controlo: positivo e negativo.

Sob um ponto de vista geral os procedimentos experimentais podem ser divididos em duas partes: 1) administrações; 2) necrópsias.

6.7.1. Administrações

6.7.1.1. Agentes farmacológicos

Um componente importante dos procedimentos experimentais foi o estabelecimento de uma imunossupressão seletiva nas aves, através da administração de agentes farmacológicos. Em cada um dos quatro grupos de estudo foi administrado um fármaco diferente com vista a supressão de diferentes células do sistema imunitário. Assim, os fármacos administrados foram a dexametasona, o 5-fluorouracilo, a ciclosporina e a ciclofosfamida, que visavam suprimir os leucócitos totais, os heterófilos, as células T e as células B, respectivamente, seguindo-se protocolos anteriormente descritos (Corrier *et al.* 1991; Kogut *et al.* 1993; Raj *et al.* 1997). Consoante as suas características e formulação disponível, os fármacos obrigaram ao uso de diferentes vias de administração que abordarei de seguida:

- a) Intramuscular (ciclosporina e ciclofosfamida) – é uma via de administração fácil e rápida, que pode ser realizada nos 2/3 proximais dos músculos peitorais, ou então na musculatura da coxa (Fig. 20.b). Apresenta como vantagens o facto de se administrar uma dose exata, cuja absorção é, geralmente, rápida. A ave deve ser capturada, mas o período de contenção é reduzido. Contudo, as injeções musculares podem ser dolorosas e causar necrose muscular (Flammer 1994). O volume injetado deve ser cuidadosamente monitorizado em animais mais pequenos.
- b) Intravenosa (5-fluorouracilo) – é uma via utilizada para fármacos de administração única. As veias utilizadas com maior regularidade são a veia jugular direita, ulnar superficial e a veia braquial na superfície ventral do úmero (Fig. 20.a). Estas veias também podem ser utilizadas para a recolha de sangue. As grandes vantagens desta técnica têm a ver com a possibilidade de administrar uma dose precisa e dos níveis terapêuticos serem rapidamente alcançados. Por outro lado é necessária contenção das aves. É, ainda, comum a formação de hematomas devido à existência de pouco tecido conjuntivo subcutâneo (Flammer 1994).
- c) Através da água (dexametasona) – é uma via de administração fácil, onde não é necessário manipular os animais e onde estes tomam o fármaco várias vezes por dia. Contudo, é uma via com algumas desvantagens: as aves apresentam um consumo inconstante e as concentrações sanguíneas do fármaco raramente são alcançadas, principalmente de noite, pois o consumo de água é ausente. Para além disso, a água medicada tem um sabor

diferente que leva a uma diminuição do consumo de água, a uma diminuição da concentração sanguínea do fármaco e a uma desidratação (Flammer 1994).

6.7.1.2. Inóculo infeccioso

Após se criar uma imunossupressão, seguiu-se o ensaio com a administração de um inóculo infeccioso nas aves. Células bacterianas de *Gallibacterium anatis*, previamente isoladas de galinhas poedeiras, foram caracterizadas fenotipicamente e genotipicamente de forma a se garantir que poderiam ser usadas para o estudo da sua patogenicidade. Tendo sido conservadas -80 °C, foram depois revitalizadas por cultura em BHI incubado a 37 °C. Foi posteriormente estimado o número de bactérias e a fase de crescimento para se fazer um ajuste da concentração. A concentração bacteriana em cada inóculo foi verificada, em duplicado, por contagem bacteriana em placas de meio COS, a partir de diluições seriadas. O inóculo foi administrado por via intranasal nos 4 grupos do estudo e no grupo de controlo positivo (Fig.20.c).

6.7.2. Necrópsia

A eutanásia e consequente necrópsia das aves caracterizaram o final do ensaio clínico. Foi uma fase que se distribuiu em cinco dias diferentes, de forma a se obterem dados de diferentes aves, com diferentes dias pós-infecção (0,3,7,10,28 dias p.i.). Por cada dia eram capturadas quatro aves de cada grupo.

A técnica de eutanásia utilizada foi farmacológica, recorrendo-se ao tiopental: era administrado 1 ml, via intravenosa, na veia braquial. De seguida, certificava-se a morte dos animais através do reflexo da córnea. Então, prosseguia-se para uma necrópsia completa dos animais, com registo das alterações verificadas. Por fim, realizava-se uma recolha de amostras, para posterior processamento, nas diversas áreas laboratoriais:

- 1) Para histologia colhia-se timo, bursa de Fabricius, baço, pulmão;
- 2) Para sorologia colhia-se soro e plasma sanguíneos;
- 3) Para imunologia colhia-se sangue para tubos com EDTA;
- 4) Para o *real-time* PCR colhia-se baço e traqueia;
- 5) Na bacteriologia realizava-se um plaqueamento direto a partir da coana, traqueia, pulmões, fígado, baço, coração, ovário, oviduto (ou testículo nos machos), duodeno e cloaca. Para além disso também se colhiam amostras de baço e traqueia para contagem de colónias em meio COS, através de diluições seriadas.

Nota: Os resultados deste projeto experimental não serão aqui expostos em virtude de, por um lado, a *Clinic for Avian, Reptile and Fish Medicine* pretender a confidencialidade destes até à publicação do artigo que este projeto vai originar, por outro, eu próprio não ter acesso a quaisquer resultados uma vez que apenas integrei temporariamente o grupo de trabalho no decurso do projeto. Este facto causa algum dissabor, uma vez que as expectativas criadas em torno da descrição do procedimento não encontram, depois, correspondência.

III. Considerações finais

Este estágio curricular foi extremamente enriquecedor, pessoal e profissionalmente, tendo superado todas as minhas expectativas. Se por um lado me permitiu sedimentar os conhecimentos adquiridos ao longo dos anos de curso em diferentes unidades curriculares, por outro deu-me a conhecer novas abordagens, novas metodologias e novas perspetivas. Para além disso, introduziu-me no fascinante mundo da investigação aplicada e ajudou-me a compreender a importância desta como motor da indústria.

Posto isto, é possível afirmar que os meus objetivos iniciais foram largamente alcançados, muito devido ao trabalho de excelência desenvolvido na *Clinic for Avian, Reptile and Fish Medicine*. Esta experiência permitiu-me perceber a importância do papel que o Médico Veterinário desempenha no ramo da produção animal, nomeadamente no setor avícola, devido ao seu conhecimento multidisciplinar, visão global e abordagem integrada. Um setor globalizado e altamente sofisticado exige soluções de qualidade para os desafios que surgem. O Médico Veterinário tem o espírito científico adequado para responder a esses desafios e assim dinamizar este ramo.

Por outro lado, as Universidades e a indústria constituem a outra parte da “equação”. As Universidades concentram em si o conhecimento mais recente disponível e têm a capacidade de produzir soluções adequadas para os problemas da indústria avícola, através da investigação científica. A indústria tem a capacidade de investimento e a vontade de se modernizar, dinamizar e tornar-se mais competitiva.

Comparando com a realidade nacional, facilmente concluímos que o caminho ainda é longo. Se por um lado as Universidades ainda não demonstram a abertura desejada, por outro observamos uma indústria refugiada no secretismo, adotando muitas vezes soluções precipitadas baseadas no empirismo. Esta interação entre a Universidade e a indústria traria resultados positivos para ambas: por um lado, a indústria iria ter mais e melhores soluções para os seus problemas, tornando-se mais moderna e dinâmica, por outro, a Universidade teria mais conhecimento e financiamento para desenvolver mais estudos e publicações, permitindo também aos alunos terem oportunidade de tomarem um contacto mais próximo com situações práticas.

IV. Bibliografia

- Abdul-Aziz T, Fletcher OJ, Barnes HJ (2008) "Hepatobiliary System" in Fletcher OJ (Ed) **Avian Histopathology** 3 Ed, American Association of Avian Pathologists, 207
- Adak GK, Long SM, O'Brien SJ (2002) "Trends in indigenous foodborne disease and deaths, England and Wales: 1992 to 2000" **Gut**, 51, 832–841
- Angulo FJ, Swerdlow DL (1999) "Epidemiology of human *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in the United States" in Saeed AM (ed.) **Salmonella enterica serovar Enteritidis in Humans and Animals**, Ames, Iowa: Iowa State University Press, 33–42
- Bailey JS, Stern NJ, Fedorka-Cray P, et al. (2001) "Sources and movement of *Salmonella* through integrated poultry operations: a multistate epidemiological investigation" **Journal of Food Protection**, 64, 1690–1697
- Barnes HJ, Nolan LK, Vaillancourt JP (2008) "Colibacillosis" in Saif YM (Eds.) **Diseases of Poultry** 12 Ed, Blackwell Publishing, 691-732
- Bermudez AJ, Boulianne M, Halvorson DA, Schrader JS, Newman LJ, Sander JE, Wakenell PS (2006^a) "Colibacillosis" in Charlton BR (Ed) **Avian Disease Manual** 6 Ed, American Association of Avian Pathologists, 77-80
- Bermudez AJ, Boulianne M, Halvorson DA, Schrader JS, Newman LJ, Sander JE, Wakenell PS (2006^b) "Fowl Pox" in Charlton BR (Ed) **Avian Disease Manual** 6 Ed, American Association of Avian Pathologists, 43-45
- Bermudez AJ, Boulianne M, Halvorson DA, Schrader JS, Newman LJ, Sander JE, Wakenell PS (2006^c) "Internal Parasites: I. Nematodes, Cestodes and Trematodes" in Charlton BR (Ed) **Avian Disease Manual** 6 Ed, American Association of Avian Pathologists, 144
- Bermudez AJ, Boulianne M, Halvorson DA, Schrader JS, Newman LJ, Sander JE, Wakenell PS (2006^d) "Internal Parasites: III. Protozoal Infections of the Digestive Tract" in Charlton BR (Ed) **Avian Disease Manual** 6 Ed, American Association of Avian Pathologists, 146-155
- Bermudez AJ, Boulianne M, Halvorson DA, Schrader JS, Newman LJ, Sander JE, Wakenell PS (2006^e) "Necropsy of the fowl" in Charlton BR (Ed) **Avian Disease Manual** 6 Ed, American Association of Avian Pathologists, 232-233
- Bermudez AJ, Stewart-Brown B (2008) "Principles of Disease Prevention: Diagnosis and Control" in Saif YM (Eds.) **Diseases of Poultry** 12 Ed, Blackwell Publishing, 5-42
- Bisgaard M (1977) "Incidence of *Pasteurella haemolytica* in the respiratory tract of apparently healthy chickens and chickens with infectious bronchitis Characterisation of 213 strains" **Avian Pathology**, 6, 285-292
- Bisgaard M, Dam A (1981) "Salpingitis in poultry. II. Prevalence, bacteriology, and possible pathogenesis in egg-laying chickens" **Nordisk Veterinær Medicin**, 33, 81-89
- Bisgaard M (1993) "Ecology and significance of *Pasteurellaceae* in animals" **Zentralblatt für Bakteriologie**, 279, 7-26
- Brenner FW, Villar RG, Angulo F, Tauxe R, Swaminathan B, (2000) "*Salmonella* nomenclature" **Journal of Clinical Microbiology**, 38, 2465–2467
- Bruggeman V, Tona K, Onagbesan O, Decuypere E (2009) "Hatching Egg and Chick Quality" in Hocking P (Ed) **Biology of Breeding Poultry**, Poultry science symposium series v. 29, CAB International, 224-239
- Castellanos L, Vazquez M, Carrillo A, Campogarrido R (2006) "Protection conferred by a commercial *Gallibacterium anatis* vaccine in commercial layers" **Boehringer Ingelheim Vetmédica, S.A. - Poultry Business Unit**, 5, 1-4
- Christensen H, Bisgaard M, Bojesen AM, Mutters R, Olsen JE (2003) "Genetic relationships among strains of biovars of avian isolates classified as '*Pasteurella haemolytica*', '*Actinobacillus salpingitidis*' or *Pasteurella anatis* with proposal of *Gallibacterium anatis* gen. nov., comb. nov. and description of additional genomospecies within *Gallibacterium* gen. nov." **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 53, 275-287
- Conway DP, McKenzie ME (2007) "Introduction to Coccidiosis" **Poultry Coccidiosis: Diagnostic and Testing Procedures** 3 Ed, Blackwell Publishing, 7-16
- Corrier DE, Elissalde MH, Ziprin RL, DeLoach JR (1991) "Effect of immunosuppression with cyclophosphamide, cyclosporin, or dexamethasone on salmonella colonization of broiler chicks" **Avian Diseases**, 35, 40-45
- Crespo R, Shivaprasad HL (2008) "Developmental, Metabolic, and Other Noninfectious Disorders" in Saif YM (Eds.) **Diseases of Poultry** 12 Ed, Blackwell Publishing, 1149-1195
- Day MJ, Schultz RD (2011) "Serological Testing" **Veterinary Immunology: Principles and Practice** 1 Ed, Manson Publishing Ltd, 39-48
- Directiva do Conselho de 15 de Outubro de 1990 relativa às condições de polícia sanitária que regem o comércio intracomunitário e as importações de aves de capoeira e de ovos para incubação provenientes de países terceiros (90/539CEE) (1990) **Jornal Oficial das Comunidades Europeias**, L303/6

Directiva do Conselho de 17 Dezembro de 1992 relativamente às medidas de protecção contra zoonoses e agentes zoonóticos especificados em animais e produtos de origem animal de modo a prevenir surtos de infecções e intoxicações de origem alimentar prevendo o estabelecimento de sistemas de monitorização para determinadas zoonoses e controlos de salmonela em determinados bandos de aves comerciais (92/117/CEE) (1993) **Jornal Oficial da União Europeia Oficial**, L 062/38

Directiva 2003/99/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 17 de Novembro de 2003 relativa à vigilância das zoonoses e dos agentes zoonóticos, que altera a Decisão 90/424/CEE do Conselho e revoga a Directiva 92/117/CEE do Conselho (2003) **Jornal Oficial da União Europeia Oficial**, L 325/31

European Pharmacopoeia (2010): 50202, 7 Ed, Council of Europe, 527-530

Flammer K (1994) "Antimicrobial Therapy" in Ritchie BW, Harrison GJ, Harrison LR (Eds) **Avian Medicine: Principles and Application** 10 Ed, Wingers Publishing Inc., 434-456

French NA (2009) "Incubation and Hatching" in Hocking P (Ed) **Biology of Breeding Poultry**, Poultry science symposium series v. 29, CAB International, 206-223

Gast RK (2008) "Paratyphoid Infections" in Saif YM (Eds.) **Diseases of Poultry** 12 Ed, Blackwell Publishing, 636-665

Hinkle NC, Hinkle L (2008) "External Parasites and Poultry Pests" in Saif YM (Eds.) **Diseases of Poultry** 12 Ed, Blackwell Publishing, 1011-1024

Hirsh DC, Zee YC, Castro AE (2004) "Laboratory Diagnosis" in Hirsh DC, MacLachlan NJ, Walker RL (Eds.) **Veterinary Microbiology** 2 Ed, Blackwell Publishing, 15-25

Humphrey TJ (1994) "Contamination of egg shell and contents with *Salmonella enteritidis*: a review" **International Journal of Food Microbiology**, 21, 31-40

Humphrey T (2006) "Public Health aspects of *Salmonella enterica* in food production" in Mastroeni P, Maskell D (Eds.) **Salmonella Infections: Clinical, Immunological and Molecular Aspects** 1 Ed, Cambridge University Press, 89-116

Jungback C, Motitschke A (2008) "The Importance of SPF-Eggs in Manufacturing and Testing of Poultry Vaccines" **Lohmann Information**, 43, 41-44

Kennedy M, Villar R, Vugia DJ *et al.*; Emerging Infections Program Food-Net Working Group (2004) "Hospitalizations and deaths due to *Salmonella* infections, FoodNet, 1996-1999" **Clin Infectious Diseases**, 15 (38 suppl. 3), S142-148

Kjos-Hanssen B (1950) "Oviduct peritonitis in hens due to pathogenic 'cloacal bacteria'" **Nordisk Veterinaer Medicin**, 2, 523-531

Kogut MH, Tellez G, Hargis BM, Corrier DE, Deloach JR (1993) "The effect of 5-Fluorouracil treatment of chicks - a cell depletion model for the study of avian polymorphonuclear leukocytes and natural host defenses" **Poultry Science**, 72, 1873-1880

Kohlert R (1968) "Untersuchungen zur Ätiologie der Eileiterentzündung beim Huhn" **Monatshefte für Veterinärmedizin** 23, 392-395

Leland D, Landry ML (2010) "Virus Isolation" in Jerome KR (Ed) **Lenette's Laboratory Diagnosis of Viral Infections** 4 Ed, Informa Healthcare USA, Inc., 98-112

Liebana E, Garcia-Migura L, Clouting C, *et al.* (2003) "Molecular fingerprinting evidence of the contribution of wildlife vectors in the maintenance of *Salmonella enteritidis* infection in layer farms" **Journal of Applied Microbiology**, 94, 1024-1029

Long PL, Reid WM (1982) "A Guide for the Diagnosis of Coccidiosis in Chickens" **Research Report 404 (Report 355 revised)**, Athens GA: College of Agriculture Experiment Station, University of Georgia

Matthes S, Hanschke J (1977) "Experimentelle Untersuchungen zur Übertragung von Bakterien über das Hühnerrei" **Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift**, 90, 200-203

McDougald LR (2008) "Internal Parasites: Introduction" in Saif YM (Eds.) **Diseases of Poultry** 12 Ed, Blackwell Publishing, 1025

McDougald LR, Fitz-Coy SH (2008) "Protozoal Infections: Coccidiosis" in Saif YM (Eds.) **Diseases of Poultry** 12 Ed, Blackwell Publishing, 1068-1085

McDougald LR, Reid WM (1991) "Coccidiosis" in Saif YM (Eds.) **Diseases of Poultry** 9 Ed, Iowa State University Press, 780-797

McIlroy SG, McCracken RM, Neill SD, O'Brien JJ (1989) "Control, prevention and eradication of *Salmonella enteritidis* infection in broiler and broiler breeder flocks" **Veterinary Record**, 125, 545-548

- Mead PS, Slutsker L, Dietz V, *et al.* (1999) "Food-related illness and death in the United States" **Emerging Infectious Diseases**, 5, 381–385
- Mirle C, Schongarth M, Meinhart H, Olm U, (1991) "Studies into incidence of *Pasteurella haemolytica* infections and their relevance to hens, with particular reference to diseases of the egg-laying apparatus" **Monatshefte für Veterinärmedizin**, 46, 545-549
- Mráz O, Vladík P, Boháček J (1976) "Actinobacilli in Domestic Fowl" **Zentralblatt für Bakteriologie und Hygiene**, Orig.A A236, 294-307
- Mushin R, Weisman Y, Singer N (1980) "*Pasteurella haemolytica* found in respiratory tract of fowl" **Avian Diseases**, 24, 162-168
- Pang T, Bhutta ZA, Finlay BB, Altwegg M (1995) "Typhoid-fever and other salmonellosis – a continuing challenge" **Trends Microbiology**, 3, 253–255
- Raj GD, Savage CE, Jones RC (1997) "Effect of heterophil depletion by 5-fluorouracil on infectious bronchitis virus infection in chickens" **Avian Pathology**, 26, 427- 432
- Regulamento (CE) N.º 2160/2003 do Parlamento Europeu e do Conselho de 17 de Novembro de 2003 relativo ao controlo de salmonelas e outros agentes zoonóticos específicos de origem alimentar (2003) **Jornal Oficial da União Europeia**, L325
- Riemann H, Kass P, Cliver D (2000) "*Salmonella enteritidis* epidemic" **Science**, 287, 1754–1755
- Roberts JA, Cumberland P, Sockett PN, *et al.* and Infectious Intestinal Disease Study Executive (2003) "The study of infectious intestinal disease in England: socio-economic impact" **Epidemiology & Infection**, 130, 1–11
- Shaw DP, Cook DB, Maheswaran K, Lindeman CJ, Halvorson DA, (1990) "*Pasteurella haemolytica* as a co-pathogen in pullets and laying hens" **Avian Diseases**, 34, 1005-1008
- Shivaprasad HL (2008) "Integumentary" in Fletcher OJ (Ed) **Avian Histopathology** 3 Ed, American Association of Avian Pathologists, 397
- Suzuki T, Ikeda A, Shimada J, Yanagawa Y, Nakazawa M, Sawada T (1996) "Isolation of '*Actinobacillus salpingitidis*'/avian *Pasteurella haemolytica*-like isolate from diseased chickens" **Journal of the Japan Veterinary Medical Association**, 49, 800-804
- Taylor MA, Coop, RL, Wall RL (2007) "The laboratory diagnosis of parasitism" **Veterinary Parasitology** 3 Ed, Blackwell Publishing, 1825-1920
- Tizard IR (2013) "Immunodiagnostic Techniques" **Veterinary Immunology** 9 Ed, Saunders, 494-514
- Tripathy DN, Reed WM (2008) "Pox" in Saif YM (Eds.) **Diseases of Poultry** 12 Ed, Blackwell Publishing, 291-307
- Turner PV, Brabb T, Pekow C, Vasbinder MA (2011) "Administration of Substances to Laboratory Animals: Routes of Administration and Factors to Consider" **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, 50, 600-613
- Voetsch AC, Van Gilder TJ, Angulo FJ, *et al.* Emerging Infections Program FoodNet Working Group (2004) "FoodNet estimate of the burden of illness caused by nontyphoidal *Salmonella* infections in the United States" **Clinical Infectious Diseases**, 38 (suppl. 3), S127–134
- Voss M (2007) "Control of *Salmonella* and other zoonotic agents in the European Community" **Lohmann Information**, 42, 18-28
- Wallis TS (2006) "Host-specificity of *Salmonella* infections in animal species" in Mastroeni P, Maskell D (Eds.) **Salmonella Infections: Clinical, Immunological and Molecular Aspects**, Cambridge University Press, 57-88
- Ward LR, Threlfall EJ, Smith HR, O' Brien SJ (2000) "*Salmonella enteritidis* epidemic" **Science**, 287, 1753–1754
- Williams JE (1981) "Salmonella in poultry feeds – a worldwide review" **World's Poultry Science Journal**, 37, 6–19
- Yazwinski TA, Tucker CA (2008) "Internal Parasites: Nematodes and Acanthocephalans" in Saif YM (Eds.) **Diseases of Poultry** 12 Ed, Blackwell Publishing, 1025-1056
- Yegani M, Butcher GD, Nilipour AH (2005) "Monitoring poultry flock health; laboratory approaches - Part II" **World Poultry**, 21, 32-33
- Zajac AM, Conboy GA, Greiner EC, Smith SA, Snowden KF (2012) "Fecal Examination for the Diagnosis of Parasitism" **Veterinary Clinical Parasitology** 8 Ed, Wiley-Blackwell, 3-14

V. Anexos

Anexo I – Bacteriologia

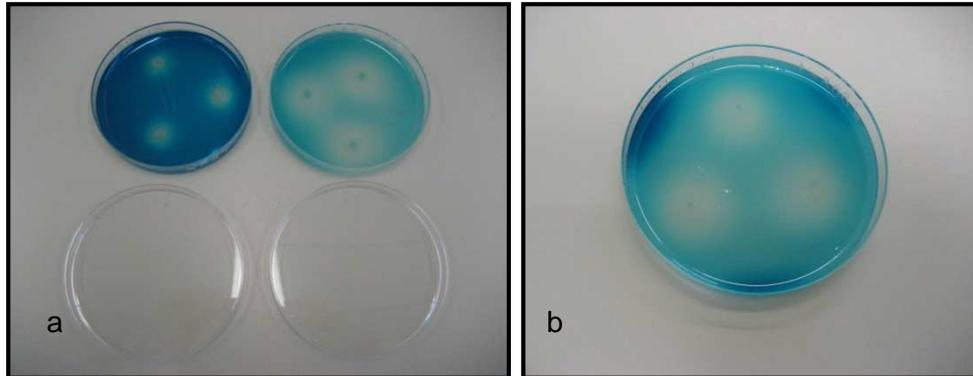


Fig. 1 a-b. – Placas MRSV após incubação; (a) Comparação de placa com crescimento negativo (à esquerda) com placa com crescimento positivo (à direita); (b) Placa com crescimento positivo. Notar halos à volta das zonas inoculadas, assim como aumento da transparência do meio. **Original**

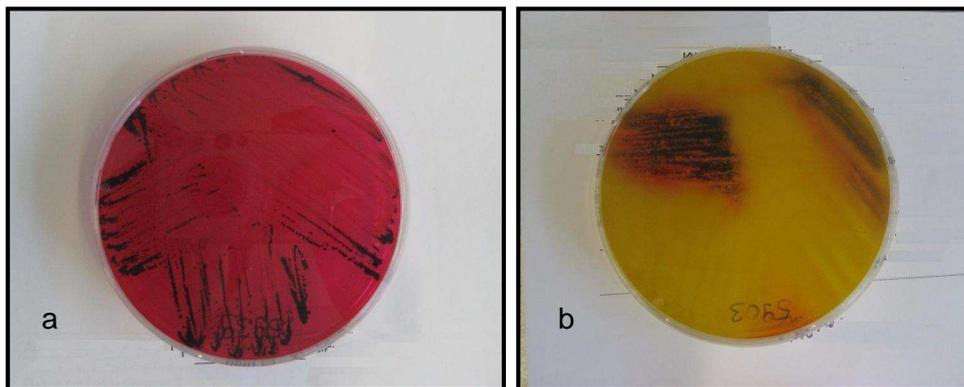


Fig. 2 a-b. – Placas de meio seletivo com crescimento positivo; (a) placa XLD com crescimento de colónias vermelhas com centro preto, típico de *Salmonella* spp.; (b) Placa de BPLS com crescimento de colónias rosa-avermelhadas de *Salmonella* spp.. **Original**

Anexo II - Sorologia

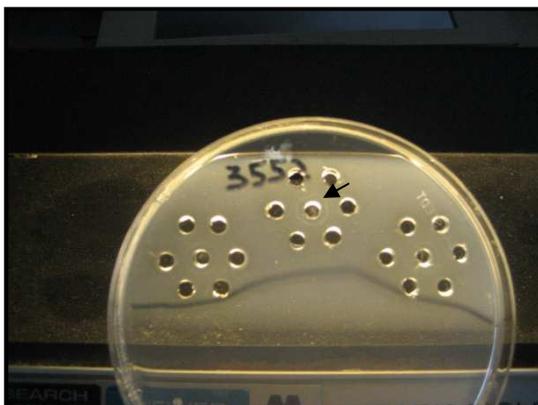


Fig. 3 – Teste de precipitação em agar-gel. É possível ver-se, em campo negro, uma linha de precipitação (seta). Neste caso há completa identidade entre o antígeno do poço central e os anticorpos dos poços periféricos. **Original**

Anexo III - Parasitologia

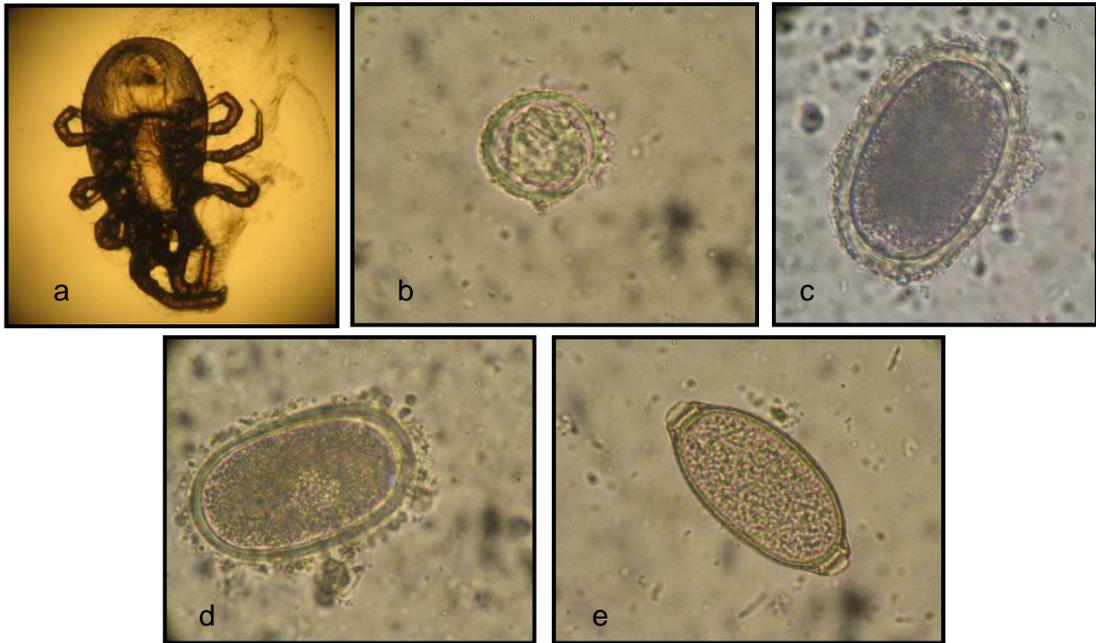


Fig. 4 a-e. – (a) Ácaro *Dermanyssus gallinae*; (b) ovo de *Choantaenia* sp., onde se visualizam no seu interior os filamentos embrionários característicos; (c) ovo de *Ascaridia galli*; (d) ovo de *Heterakis gallinarum*; (e) ovo de *Capillaria* spp., tipicamente bipolar. **Original**

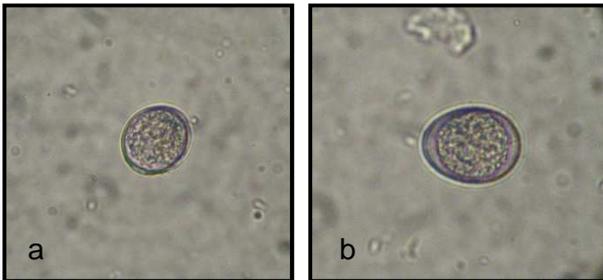


Fig. 5 a-b. – Oocistos de *Eimeria* de diferentes espécies. **Original**

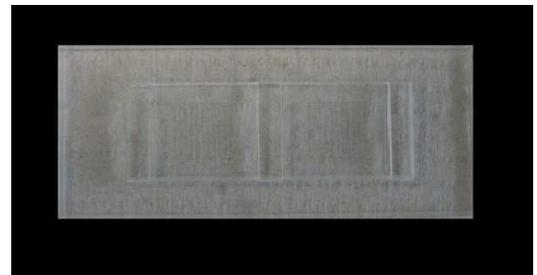


Fig. 6 – Câmara de McMaster. **Original**

Anexo IV - Virologia

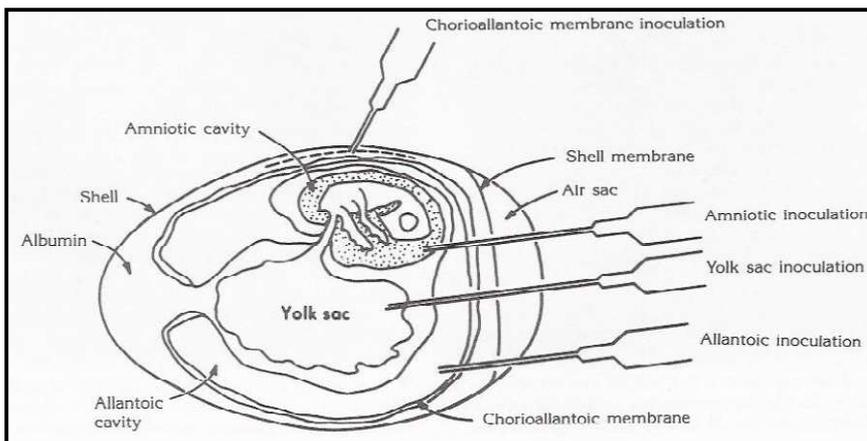


Fig. 7 – Esquema representativo das vias de inoculação, em ovos embrionados, para o isolamento viral. **Adaptado de Hirsch et al. 2004**

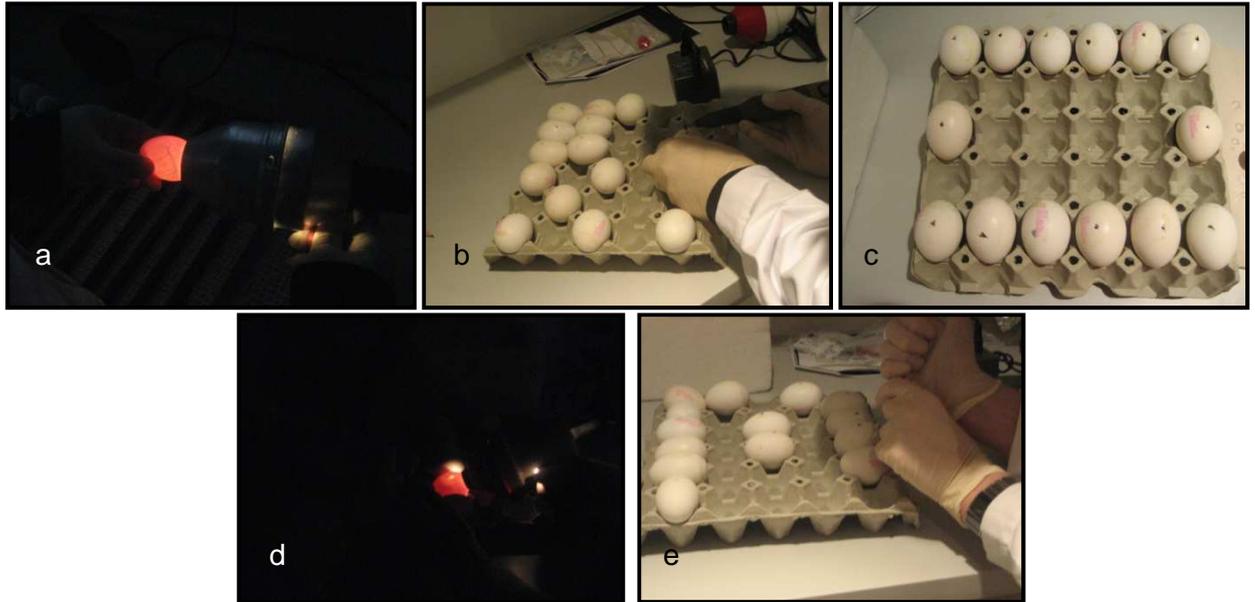


Fig. 8 a-e. – Processo de isolamento viral, em ovos de galinha embrionados, pela via de inoculação da membrana corioalantóica; (a) análise do ovo ao ovoscópio de forma a se realizar a marcação de uma zona pouco vascularizada; (b) realização de corte na casca; (c) “janelas” para a inoculação; (d) análise ao ovoscópio onde é possível ver câmara-de-ar que se formou na zona das “janelas”; (e) deposição de inóculo. **Original**

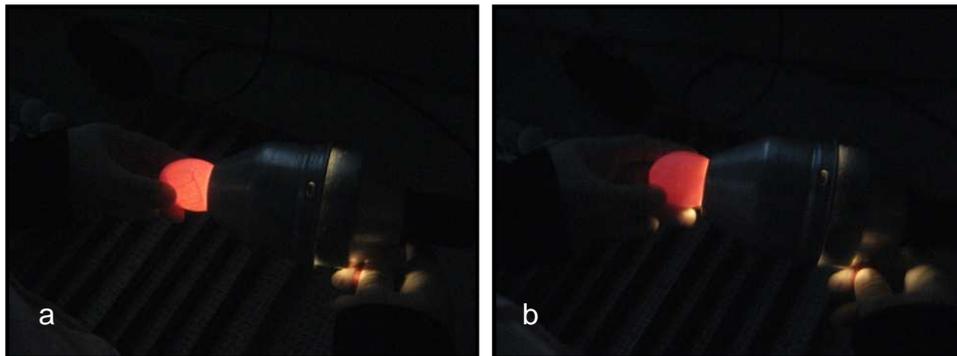


Fig. 9 a-b. – Análise de ovos embrionados inoculados ao ovoscópio; (a) a visualização de uma rede de vasos bem desenvolvida confirma a viabilidade do embrião; (b) ausência de vasos e movimento atesta a morte embrional.

Original



Fig. 10 – Etapa final no isolamento viral: exame visual dos embriões e das membranas do ovo. O aspeto hemorrágico deste embrião e membranas deve-se à manipulação. **Original**

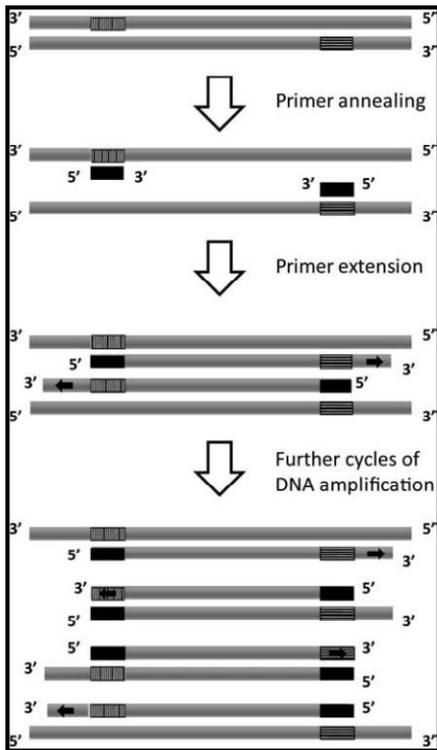


Fig. 11 – Polymerase chain reaction. Numa primeira fase o ADN de cadeia dupla é desnaturado a quente (94°C-97°C), sendo seguidamente arrefecido (50°C-65°C), permitindo aos *primers* ligarem-se às sequências complementares de cada cadeia do ADN alvo. Seguidamente a enzima ADN polimerase vai-se ligar à extremidade 3' de cada *primer*, iniciando uma extensão, criando novas cópias de cadeia dupla, do ADN alvo que, em seguida, podem atuar como modelos adicionais para a amplificação de ADN. **Adaptado de Leland & Landry 2010**

Anexo V – Anatomia patológica

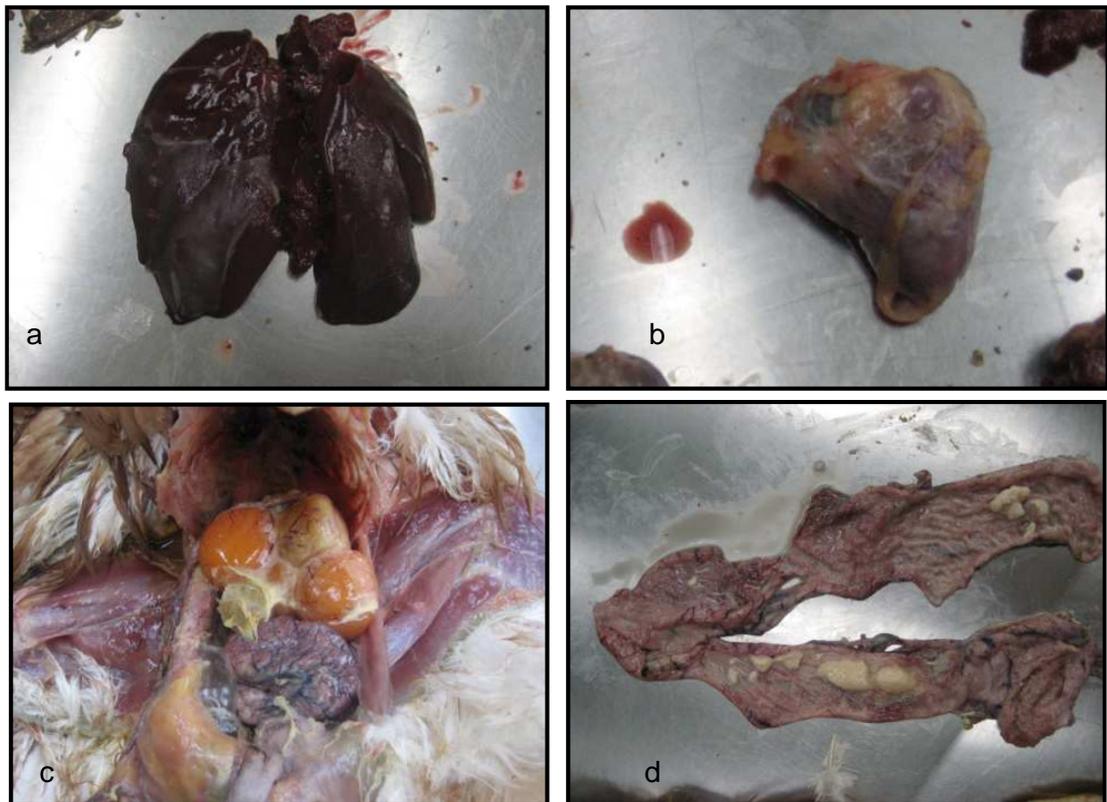


Fig. 12 a-d. – Coliseticémia: achados de necrópsia; (a) fígado com perihepatite, hepatomegalia e congestão; (b) coração com pericardite; (c) ooforite na cavidade abdominal; (d) salpingite com presença de massas caseosas no seu conteúdo. **Original**

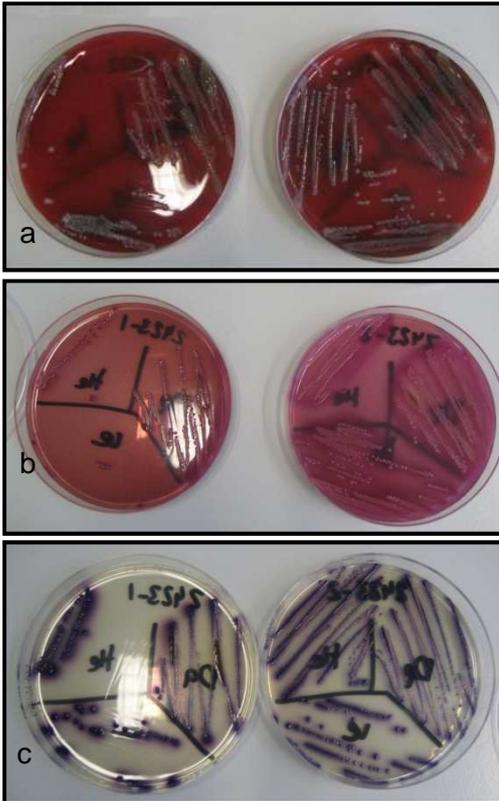


Fig. 13 a-c. – Crescimento de colónias de *E. coli* nos diferentes meios: (a) agar-sangue (COS); (b) McConkey agar; (c) Coliforme agar. **Original**



Fig. 14 – Ganso com pênis prolapsado e necrótico. **Original**

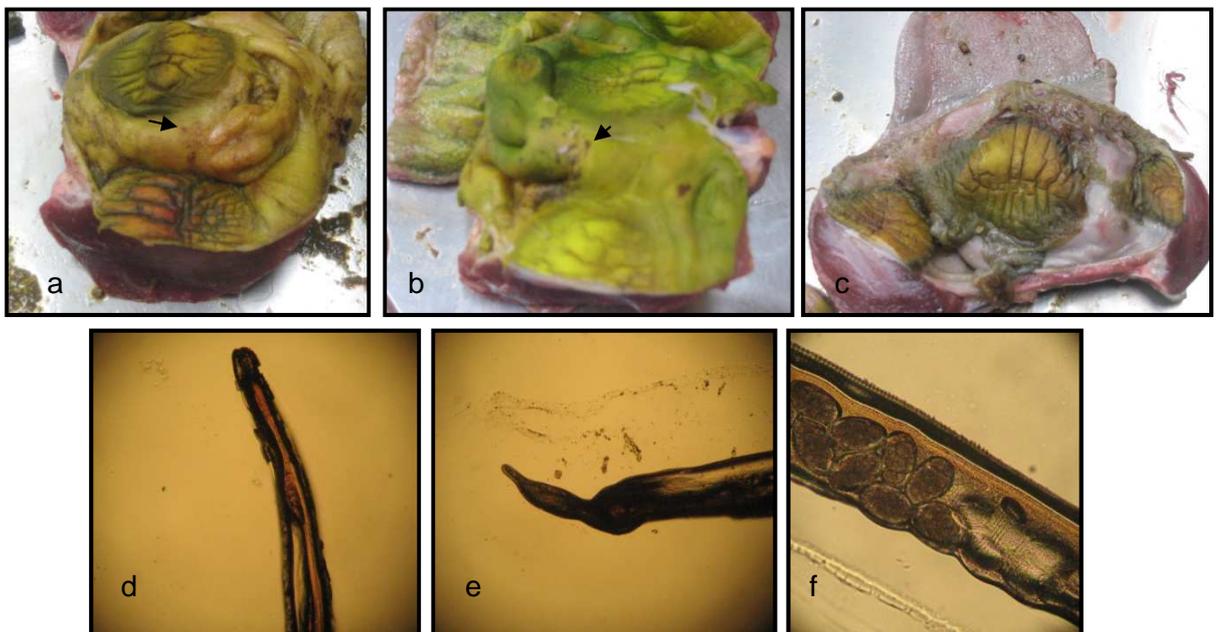


Fig. 15 a-f. – Moelas parasitadas por *Amidostomum anseris*; (a) moela com pontos hemorrágicos na cutícula (seta); (b) moela com pequenas larvas na cutícula (seta); (c) moela com cutícula de queratina destruída, necrótica e laxa; (d) imagem microscópica da região anterior do parasita *Amidostomum anseris*; (e) imagem microscópica da região posterior do parasita *Amidostomum anseris*; (f) pormenor do parasita *Amidostomum anseris*, onde é possível visualizar-se ovos no seu interior. **Original**

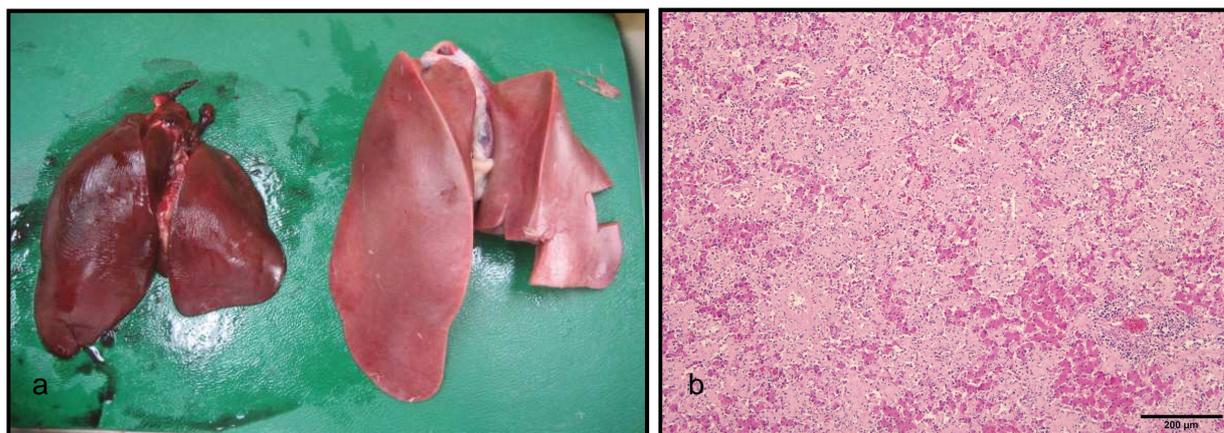


Fig. 16 a-b. – (a) Fígado normal (à esquerda) e fígado alterado (à direita). Este encontra-se aumentado, de forma difusa, com uma cor pálida e as superfícies apresentam um aspeto ceroso liso; (b) imagem histológica do fígado alterado, compatível com amiloidose: presença de material eosinofílico, amorfo (amilóide) que oblitera e substitui os hepatócitos. Apenas conjuntos de hepatócitos são reconhecidos. **Original**

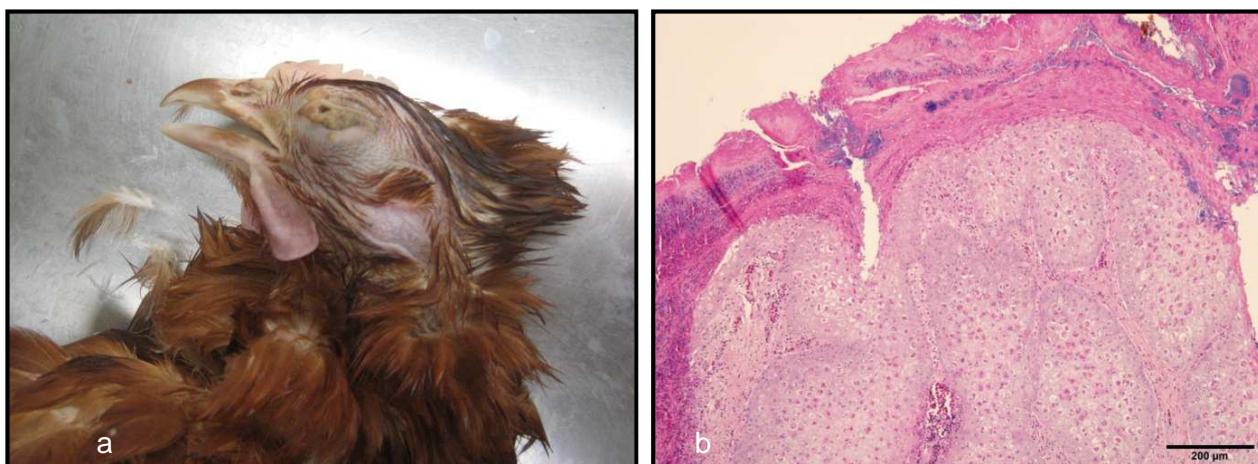


Fig. 17 a-b. – (a) Região da cabeça de galinha poedeira, onde é possível observar-se a zona periocular tumefacta e lesões nodulares nas pálpebras; (b) imagem histológica das lesões nodulares palpebrais, consistentes com o diagnóstico de varíola aviária (poxvírus): hiperplasia severa (acantose) e hipertrofia das células epiteliais, associadas a inclusões intracitoplasmáticas do poxvírus. Presença de zonas de inflamação, assim como balonamento degenerativo das células com inclusões. **Original**

Anexo VI – Ensaio experimental



Fig. 18 – Segunda fase da incubação: dia da eclosão. É possível observar-se alguns pintos já nascidos. Quer a temperatura quer a humidade devem ser controladas diariamente através do painel de controlo.

Original

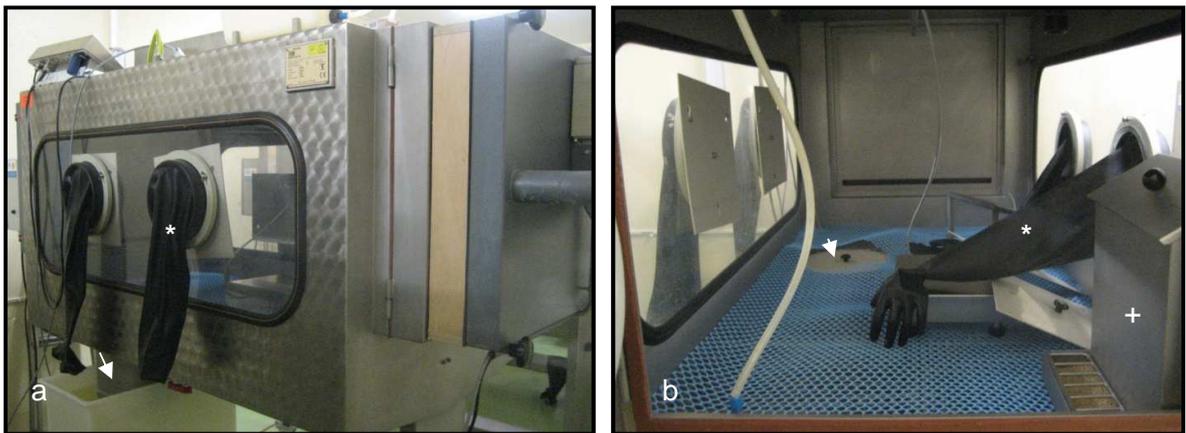


Fig. 19 a-b – Câmara de isolamento biológico; (a) parte exterior, onde é possível observar luvas de manipulação invertidas para fora (*) e uma conduta, com acesso ao interior, emergida num tanque com água (seta); (b) parte interior, onde é possível observar as luvas de manipulação (*), o alçapão que é usado para introduzir comida na câmara (seta) e o comedouro (+). **Original**



Fig. 20 a-c – Procedimentos experimentais: administrações; (a) Administração intravenosa; (b) Administração intramuscular; (c) Administração de inóculo infeccioso com *Gallibacterium anatis*, por via intranasal. **Original**

Agente	Teste utilizado	Transmissão vertical	Propagação
Adenovírus aviários, grupo 1	AGP; EIA	Sim	Lenta
Vírus da encefalomielite aviária	AGP; EIA	Sim	Rápida
Vírus da bronquite infecciosa	HI; EIA	Não	Rápida
Vírus da laringotraqueíte infecciosa	VN; EIA	Não	Lenta
Vírus da leucose aviária	EIA para vírus, VN, EIA para anticorpos	Sim	Lenta
Vírus da nefrite aviária	IS	Não	Lenta
Orthoreovírus aviário	IS; EIA	Sim	Lenta
Vírus da Reticuloendoteliose aviária	AGP; IS; EIA	Sim	Lenta
Vírus da anemia infecciosa	IS; EIA; VN	Sim	Lenta
Vírus da síndrome de queda de produção de ovos	HI; EIA	Sim	Lenta
Vírus da doença de Gumboro	Serótipo 1: AGP; EIA; VN Serótipo 2: VN	Não	Rápida
Vírus da Influenza A	AGP; EIA; HI	Não	Rápida
Vírus da doença de Marek	AGP	Não	Rápida
Vírus da doença de Newcastle	HI; EIA	Não	Rápida
Vírus da rinotraqueíte dos perús	EIA	Não	Lenta
<i>Mycoplasma gallisepticum</i>	Agg e HI para confirmar um teste positivo, EIA, HI	Sim	Lenta
<i>Mycoplasma synoviae</i>	Agg e HI para confirmar um teste positivo, EIA, HI	Sim	Rápida
<i>Salmonella pullorum</i>	Agg	Sim	Lenta

Agg: aglutinação

AGP: precipitação em agar-gel

EIA: ensaio imunoenzimático

HI: inibição da hemaglutinação

IS: imunocoloração

VN: neutralização viral

Quadro 4 – Lista de agentes para os quais os bandos SPF têm que ser testados e cujos resultados têm que ser negativos. **Adaptado de European Pharmacopoeia 2010**