UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

doutorado

BC/46103
IB/ 81672

INSTITUTO DE BIOLOGIA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Isabela Cristina Simoni

UTILIZAÇÃO DE DIFERENTES LINHAGENS CELULARES PARA PROPAGAÇÃO DO VÍRUS DA DOENÇA INFECCIOSA DA BURSA

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo (a) candidato (a) Isabela Cristina Simoni e aprovada pela Comissão Julgadora.

7/6/2001

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor em Genética e Biologia Molecular na Área de Microbiologia

Orientadora: Prof. Dra Clarice Weis Arns

2001

UNIDADE I13/81672
N.º CHAMADA:
T/UNICAMP
Si57u
V. Ex.
TOMBO BC/46103
PROC. 16-392/01
C D
PREÇO R$ 11,00
DATA 16-02-01
N.º CPD

CM00154806-9

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

Simoni, Isabela Cristina

Si57u Utilização de diferentes linhagens celulares para propagação do vírus da doença infecciosa da bursa/ Isabela Cristina Simoni. - - Campinas, S.P.[s.n.], 2001.
94f: ilus.

Orientadora: Clarice Weis Arns
Tese(doutorado) – Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.

1. Avicultura. 2. Culturas celulares. 3. Microbiologia. 4. Virologia. I. Arns, Clarice Weis. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Data da defesa: **07/06/2001**

Banca examinadora:

Profª. Drª. Clarice Weis Arns (orientadora) _____

Prof. Dr. Aramis Augusto Pinto _____

Profª. Drª. Alda Maria Backx Noronha Madeira _____

Profª. Drª Flávia Saldanha Kubrusly _____

Profª. Drª Liana Maria Cardoso Verinaud _____

Profª. Drª Maria Silvia Viccari Gatti _____

Profª. Drª Edviges Maristela Pituco _____

Aos meus filhos
Pedro e Julia
Ao meu companheiro
Marco Pasquini
Aos meus pais

DEDICO

"Se não houver frutos
Valeu a beleza das flores
Se não houver flores
Valeu a sombra das folhas
Se não houver folhas
Valeu a intenção da semente"

Autor que desconheço

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Profa. Dra Alda Maria Backx Noronha Madeira pela importante contribuição científica e inestimável força que impulsionou minha vida profissional, nunca deixando de estar presente em todos os momentos com seus conselhos na medida exata.

À minha querida amiga, muito mais que simples colega, Maria Judite B. Fernandes pela atenção, apoio incondicionais em todos os momentos, para todos os desafios.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Clarice Weis Arns, pela orientação e oportunidade.

Às Dras Ignes Koseki e Tauba G. Abuhab pelos ensinamentos iniciais em Virologia e Biologia Celular.

Às bolsistas de iniciação científica Camile e Camila do Laboratório de Biologia Celular do Instituto Biológico, pelo companheirismo e suporte técnico na realização do presente trabalho.

Aos funcionários e estagiários do Laboratório de Biologia Celular que colaboraram de alguma forma para a realização deste trabalho e em especial atenção à Maria Luiza B. dos Santos por sua paciência, boa vontade e constante disponibilidade na preparação dos materiais de laboratório.

Ao Instituto Biológico que não foi apenas um local de trabalho mas proporcionou todo o suporte que necessitei para a execução deste trabalho.

Aos colegas dos Laboratórios Regionais do Instituto Biológico de Descalvado e Bastos pela concessão de bursas de frangos de corte e aves de postura, respectivamente.

Ao Laboratório BIO-VET pelo fornecimento dos ovos embrionados, soro hiperimune de galinha, meios e soluções sem os quais seria impossível a realização desta pesquisa.

À Helena Gallicchio Domingues pela inoculação e preparo dos soros hiperimunes em coelhos.

À Dra Iukie pela imensa ajuda e colaboração na análise estatística dos dados deste trabalho.

À todos os funcionários do Instituto Biológico que significaram para mim uma casa cheia de amigos sempre me apoiando em tudo que precisei colaborando de alguma maneira para a realização deste trabalho.

Aos colegas de pós-graduação, funcionários e professores do Departamento de Microbiologia e Imunologia, do Instituto de Biologia da UNICAMP, que sempre se mostraram dispostos a me ajudar em todos os momentos.

Aos meus dois queridos filhos Pedro e Julia, e ao Marco Antonio pela confiança e apoio a mim dedicado, e por serem as pessoas que mais adoro neste mundo.

À minha mãe e meu pai que sempre estiveram presentes dentro do meu coração.

À minha cunhada Lucia que percebi ser muito mais quando já não a tinha comigo.

À minha irmã e minha tia, pelo apoio e incentivo nos momentos dificeis.

O presente trabalho foi realizado principalmente no Laboratório de Biologia Celular do Centro de Sanidade Animal do Instituto Biológico. A imunização em coelhos foi realizada no Laboratório de Virologia do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas. Grande parte da propagação das amostras virais em ovos embrionados foi realizada no Laboratório de Ornitopatologia do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS X

LISTA DE QUADROS E TABELAS XI

LISTA DE ABREVIATURAS XIII

ABSTRACT XIV

RESUMO XVI

1. INTRODUÇÃO 1

1.1-HISTÓRICO 1
1.2-PATOGENIA E SINAIS CLÍNICOS DA DOENÇA DE GUMBORO 7
1.3-CARACTERÍSTICAS GERAIS DO IBDV 9
1.4- CARACTERÍSTICAS ANTIGÊNICAS DO IBDV 10
1.5-ISOLAMENTO E PROPAGAÇÃO DO IBDV 12

2. OBJETIVOS 15

3. MATERIAL E MÉTODOS 16

3.1. CULTURAS CELULARES 16
3.2. AMOSTRAS VIRAIS 18
3.2.1 Vacinas *18*
3.2.2. Amostras de campo *18*
3.3. INOCULAÇÃO VIRAL 19
3.3.1. Inoculação in vivo *19*
3.3.2. Inoculação in vitro *20*
3.4. TITULAÇÃO VIRAL 21
3.5. SOROS HIPERIMUNES 22
3.5.1 Antígeno viral *22*
3.5.2 Produção do soro *22*
3.6. TESTE DE VÍRUS NEUTRALIZAÇÃO RECÍPROCO 23
3.7 INOCULAÇÃO EXPERIMENTAL DE MISTURA DE REOVÍRUS E IBDV EM 23
RK-13 E EM CER 23
3.8. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA 24
3.8.1. Extração do ácido nucleico *24*
3.8.2. Preparo do gel e corrida eletroforética *25*

3.8.3. Coloração do gel *25*
3.8.4. Preservação do gel *26*

4. RESULTADOS **27**

4.1 IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS PELA DETECÇÃO DO RNA VIRAL 27
4.2 PROPAGAÇÃO DAS SUSPENSÕES VIRAIS EM OVOS EMBRIONADOS 29
4.2. PROPAGAÇÃO DE VÍRUS EM DIFERENTES CULTIVOS CELULARES 31
4.2.1- Propagação de amostras vacinais *31*
4.2.2- Propagação de amostras suspeitas de IBDV *35*
4.3- SUSCETIBILIDADE DE DIFERENTES LINHAGENS CELULARES AO IBDV E REOVÍRUS 41
4.4. TITULAÇÃO VIRAL 44
4.4 ENSAIOS DE VÍRUS NEUTRALIZAÇÃO 46
4.5. PROPAGAÇÃO DAS AMOSTRAS BA E BF EM RK-13 50
4.6. INOCULAÇÃO EXPERIMENTAL DE AMOSTRAS DE REOVÍRUS E IBDV EM RK-13 E EM CER 52 52

5. DISCUSSÃO **55**

5.1-IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS PELA DETECÇÃO DO ÁCIDO NUCLÉICO VIRAL 55
5.2- PROPAGAÇÃO *IN VIVO* 57
5.3- PROPAGAÇÃO *IN VITRO* 58
5.4- SUSCETIBILIDADE DE DIFERENTES LINHAGENS CELULARES AO IBDV E REOVÍRUS 61
5.5- TITULAÇÃO VIRAL 63
5.6- ENSAIOS DE VÍRUS-NEUTRALIZAÇÃO 63
5.7- PROPAGAÇÃO DO IBDV DE BURSA EM CÉLULAS RK-13 65
5.8- INOCULAÇÃO EXPERIMENTAL DE UMA MISTURA DE REOVÍRUS E IBDV EM CÉLULAS RK-13 E EM CER 66

6. CONCLUSÕES **69**

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS **70**

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Eletroforese em gel de poliacrilamida de amostras de campo provenientes de suspensões de culturas celulares primárias infectadas.....29

figura 2: Eletroforese em gel de poliacrilamida de amostras de campo provenientes de macerados da bursa de Fabrícius de aves.....29

Figura 3: células RK-13 não inoculadas e inoculadas com IBDV exibindo efeito citopático degenerativo.....34

Figura 4: células CER não inoculadas e inoculadas com reovírus S1133 exibindo efeito citopático sincicial.....38

Fluxograma 1: Passagem das amostras BA e BF a partir de macerados de bursas *in vivo e vitro*.....52

Figura 5: Eletroforese em gel de poliacrilamida das amostras de Reovírus, Gumboro e mistura dos dois vírus (RG).....54

LISTA DE QUADROS e TABELAS

QUADRO 1: Relação das amostras do IBDV de vacinas utilizadas, relacionadas de acordo com código adotado no laboratório e sua procedência..... 17

QUADRO 2- Relação das amostras de campo agrupadas de acordo com código adotado no laboratório 19

Tabela 1: Mortalidade após 3 a 5 dias pós-inoculação e padrão de lesão da última passagem em ovos embrionados de amostras identificadas como IBDV.....30

Tabela 2: Mortalidade após 6 a 8 dias pós-inoculação e padrão de lesões encontradas na última passagem em OE das amostras identificadas como Reovírus.....30

Tabela 3: Resultado das inoculações de diferentes vacinas comerciais em FEG e nas linhagens celulares CER e RK-13.....32

Tabela 4: Suscetibilidade de diferentes culturas celulares a amostras vacinais.....34

Tabela 5 – Resultados das inoculações de amostras suspeitas que exibiram ECP em FEG e que *não* foram identificadas por PAGE e VN como IBDV em cultura de fibroblasto de embrião de galinha.....38

Tabela 6 - Resultados das inoculações de amostras suspeitas que exibiram ECP em FEG e que *não* foram identificadas por PAGE e VN como IBDV nas linhagens celulares CER e RK-13.....39

Tabela 7: Resultados das inoculações de amostras suspeitas de IBDV em FEG e na linhagem celular RK-13 (amostras que causaram ECP em FEG e que *foram* identificadas por PAGE e VN como IBDV).....40

Tabela 8: Suscetibilidade de linhagens celulares e detecção de RNA do IBDV (amostra GBV-8) e reovirus (amostra S1133).....42

Tabela 9 : Título viral médio obtido em FEG das amostras de Reovirus e IBDV propagadas em diferentes linhagens celulares.....43

Tabela 10 – Título médio em $DICC_{50}$/50µl de amostras de IBDV.....45

Tabela 11: Média geométrica dos títulos obtidos no teste de VN realizados em FEG..... 47

Tabela 12: Comparação da média dos títulos obtidos no teste de vírus-neutralização realizados em células RK-13 e FEG.....49

Tabela 13: Relação antigênica entre as amostras virais obtidas em células FEG.....49

Tabela 14: Relação antigênica entre as amostras virais obtidas em células RK-13.....50

Tabela 15: Propagação da mistura de reovírus e IBDV em células RK-13.....54

Tabela 16: Passagem da amostra-mistura RG nas células CER.....54

LISTA DE ABREVIATURAS

BF = bursa de fabricius

BHK-21= baby hamster kidney-21

CER= chicken embryo related

DIB = doença infecciosa da bursa

$DICC_{50\%}$ = dose infectante em cultura de células 50%

DEG= efeito citopático degenerativo

ECP = efeito citopático

FEG = cultura primária de fibroblasto de embrião de galinha

IB-RS-2= Instituto Biológico-rim suíno-2

IBDV = vírus da doença infecciosa da bursa (= "infectious bursal disease virus")

MCA = membrana corion alantóide

MEM = meio mínimo essencial de Eagle

PAGE = eletroforese em gel de poliacrilamida

SFB = soro fetal bovino

SPF = isentos de patógenos

SYN= efeito citopático misto com sincícios e células arredondadas

VN = vírus-neutralização

RG= Reovírus e Gumboro

RK-13= "rabbit kidney-13

SK-6= "swine kidney"-6

Vero= "african green monkey kidney"

ABSTRACT

Simoni, I.C. (2001) Utilização de diferentes linhagens celulares para a propagação vírus da doença infecciosa da bursa. Tese de Doutorado, Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biologia, UNICAMP, Republica Federativa do Brasil.

Keywords: virology, infectious bursal disease virus, susceptibility, cell line.

Infectious bursal disease is an acute highly contagious viral infection, which results in immunosupression or mortality in young chickens and in considerable economic losses for poultry industry worldwide. Infectious bursal disease virus (IBDV) is a bi-segmented double-stranded RNA virus beloning to the family *Birnaviridae*. The antigenic site responsible for the induction of neutralization antibodies against IBDV been located on VP2, one of the major virus structural protein. The IBDV broad antigenic diversity makes continued isolation and antigenic analysis of field viruses imperative, although isolation of IBDV from field cases may be difficult to conducted. The purpose of the present study was to broaden the number of easily available cell culture systems that could support the replication of different IBDV strain with production of evident cytopathic effect (CPE) and be used in routine virus neutralization tests. Various serotype 1 commercial live-attenuated vaccines and virus field samples adapted on chicken embryo fibroblast culture were propagated in continuous cell lines (CER, IB-RS-2, SK-6, RK-13, BHK-21 and Vero). All cell lines were susceptible to IBDV at least one virus sample however the RK-13 cell line supported the replication of several IBDV samples with cytopathic effect most pronounced and with earlier occurrence. Polyacrylamide

gel electrophoresis of the viral genomes from field isolates (n=43) was carried out and compared with vaccine strains (n=10). The IBDV genomes were detected in 40% of field samples. Of the IBDV negative samples, 54% showed CPE in FEG and in 28,6% avian reovirus was detected. Of the IBDV positive isolates, 76,6% showed CPE in FEG and in RK-13 cell line. Virus-neutralization tests were conducted using the chicken embryo fibroblast (CEF) and RK-13 cultures with comparable results. The RK-13 culture system can be used to replace the CEF system, for virus isolation and even in virus-neutralization test.

RESUMO

O vírus da doença infecciosa da bursa (IBDV) ou vírus da doença de Gumboro, é o agente etiológico da doença infecciosa da bursa de galinha e é altamente contagioso tanto para frangos de corte como para aves de postura. Pelas características genômicas (RNA fita dupla segmentado) e antigênicas (proteína VP2), este vírus apresenta elevada variabilidade fazendo com que o mesmo escape da imunidade materna conferida aos pintos de um dia, bem como da imunidade conferida pelas vacinas atenuadas que são empregadas em granjas brasileiras. Para estudar amostras suspeitas de IBDV é necessário o isolamento do vírus em sistemas sensíveis como ovo embrionado ou cultura primária de fibroblasto embrião de galinha (FEG). Poucos são os trabalhos utilizando linhagens celulares estabelecidas e contínuas como células obtidas de rim de coelho (RK-13), de embrião de galinha (CER), de rim de macaco verde (Vero), de rim de hamster (BHK-21) e as de rim suíno (SK-6 e IB-RS-2). Este trabalho teve a finalidade de estabelecer qual a melhor linhagem celular para a propagação viral e realização de testes de vírus-neutralização. Para a execução deste estudo, além das amostras vacinais (n=10), foram também propagadas amostras de campo suspeitas de IBDV (n=43). Durante a propagação das amostras de IBDV em cultura primária e linhagens contínuas foram analisados vários aspectos como tipo do efeito citopático (ECP), número de passagens para o aparecimento do ECP, as horas após a inoculação em que se verifica o início do ECP. De acordo com a morfologia observada nas monocamadas infectadas, as células exibiram dois tipos de ECP denominados de DEG (degenerativo) e SYN (sincicial ou misto). Todas as 53 amostras foram também submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE). O RNA

viral do IBDV foi detectado em 40% das amostras de campo e em todas as amostras vacinais. Nas amostras que foram negativas para IBDV, 54% causaram ECP em FEG, e em 28,6% das amostras, detectou-se o reovírus. Nas identificadas como IBDV foi observado ECP tanto em FEG como em RK-13 em 76,6%, sendo que o CPE foi mais pronunciado nas células RK-13 quando comparado com as outras linhagens contínuas. Portanto a linhagem celular RK-13 foi escolhida para a propagação do IBDV.

1. INTRODUÇÃO

1.1-Histórico

Em 1957, Albert S. Cosgrove, trabalhando no Delaware Poultry Laboratories, verificou numa granja perto da localidade de Gumboro nos Estados Unidos, uma doença que inicialmente foi denominada de "nefrose aviária". Esta enfermidade foi descrita pela primeira vez em 1962 e denominada então como doença de Gumboro (Cosgrove, 1962; Lasher & Davis, 1997). Em 1964 já tinham sido relatados casos da doença em todos os 13 estados produtores de frangos de corte desse país (Lasher & Davis, 1997). Allen Edgar e Yung Cho verificaram que a disseminação da doença ocorria pela reutilização de ração proveniente de granjas afetadas (Edgar & Cho, 1976).

Durante vários anos, a etiologia do agente da doença infecciosa da bursa (DIB) foi confundida com a do vírus da bronquite infecciosa pois as lesões presentes nos rins eram bastante semelhantes (Winterfield & Hitchner, 1962). A etiologia da doença de Gumboro só foi diferenciada da bronquite infecciosa quando aves imunizadas com os isolados da bronquite infecciosa não foram protegidas contra a DIB desenvolvendo lesões específicas na bursa de Fabricius (BF) (Lukert & Saif, 1991).

Após a identificação de que o vírus da DIB tratava-se de um novo agente, começaram as primeiras tentativas de isolamento do mesmo em ovos embrionados. Porém, o padrão de mortalidade foi irregular e dificil de manter através de passagens seriadas (Lukert & Saif, 1991). Hitchner (1970) observou então que o uso de embriões não suscetíveis, dificultava o isolamento e a identificação do agente.

No início dos estudos sobre o vírus da DIB se trabalhavam com homogeneizados de tecido para a sua caracterização *in vivo*. Assim, Cheville (1967) examinou o efeito adverso de uma amostra isolada por Edgar em células linfóides da BF revelando necrose dos elementos linfóides e fagocitose na região cortical dos folículos decorrentes de reação inflamatória. Cho e Edgar (1968) utilizando aves infectadas experimentalmente documentaram pela primeira vez as lesões na bursa. Irwin Moulthrop e Carol Wills trabalhando com seu próprio material adaptou uma amostra em embrião de galinha que se tornou a primeira vacina licenciada, a Bursa Vac® (Snedeker *et al*, 1967). Benton usou um isolado de amostras de tecido de um caso de número 2512 que depois foi usado para fabricação da vacina "Winterfield 2512" (Winterfield, 1969). A partir desta amostra, já atenuada após 20 passagens em ovos embrionados, Winterfield (1969), descreveu a patogênese do vírus, seu tropismo e persistência; solucionando o problema da dificuldade em se propagar o vírus em alguns ovos embrionados pois este, parecia refratário à infecção. O autor mostrou que ovos de reprodutoras imunizadas eram resistentes à infecção pois como nesta época não se produziam ovos isentos de patógenos (SPF), muitos podiam ter anticorpos maternais. Mesmo assim, usando ovos de aves de granjas suscetíveis ainda era difícil isolar e manter o vírus em passagem seriada. Isto somente foi resolvido pela escolha certa da via de inoculação, pois os pesquisadores da época costumavam realizar estas passagens via saco corion alantóde ou via saco vitelino, ao invés de propagar o vírus pela membrana corion alantoide (Hitchner, 1970). Por isso é que o vírus da bronquite replicando-se melhor na via saco corion alantoide do que o vírus da DIB pode ser recuperado dos tecidos. (Lasher & Davis, 1997).

Hitchner (1970) comparando a resistência de lotes de aves imunizadas e não imunizadas frente ao desafio com uma amostra virulenta verificou que os anticorpos maternais protegiam da patogenia da bursa em aves de até 3 semanas de idade verificando que a progênie de aves não imunes também é

refrataria à doença clínica durante os primeiros 21 dias. Até então não se sabia da manifestação da forma subclínica da DIB e do papel imunossupressor do vírus que somente foi bem conhecido algum tempo depois (Sharma & Lee, 1983; Müller, 1986).

Allan et al. (1972), foram os primeiros a relatar imunossupressão em infecções de aves com menos de 3 semanas e imunizadas contra a doença de Newcastle.

Giambrone *et al.* (1976) estudaram o efeito inicial da exposição natural ao vírus da DIB na resposta imune aos vírus da doença de Marek ou ao vírus da doença de Newcastle. As aves foram colocadas em ambiente contaminado com o vírus da DIB e vacinadas contra a doença de Newcastle ou de Marek a 1 e 28 dias, respectivamente, e tiveram resposta imune deprimida quando comparadas com aves vacinadas colocadas em área limpa. Depois se relacionou a idade da exposição ao vírus da DIB com efeito imunossupressor contra antígenos específicos.

Kaufer & Weiss (1980), trabalhando com aves de 4 semanas bursectomizadas cirurgicamente e então inoculadas com vírus virulento imediatamente ou uma semana depois da retirada da bursa, observaram que não havia manifestação de sinais clínicos, porém todas as aves controle, cuja bursa não havia sido retirada, morriam. Estas aves bursectomizadas também produziam menos lesões, apenas com necrose discreta e transitória dos tecidos linfáticos e produziam bem menos vírus do que as aves controle não bursectomizadas.

Durante os primeiros dez anos da identificação do agente da DIB, vários trabalhos foram relatados sobre a caracterização bioquímica do vírus demonstrando a sua resistência a condições extremas de pH e de temperatura e a vários tipos de tratamentos químicos (Benton *et al.*, 1967; Cho & Edgar, 1969; Lukert & Davis, 1974). Estes achados explicam o papel importante da ração e fômites na transmissão da doença. Devido às características de sua natureza, somente em 1976 foi possível

descrever melhor o vírus (Nick, *et al.*, 1976). Através dos conhecimentos físicos, químicos e morfológicos foi possível classificá-lo em uma nova categoria taxomônica pertencente à família *Birnaviridae* (Becht, 1981). Antes do reconhecimento das características da família *Birnaviridade*, foram classificados ou como *Reoviridae* (Koster *et al.*, 1972; Lukert & Davis, 1974; Harkness *et al.*, 1975) e/ou como *Picornaviridae* (Cho & Edgar, 1969; Lunger & Maddux, 1972).

Muitos esforços foram feitos pelos pesquisadores como Edgar, Moulthrop e Winterfield em trabalhos independentes para a produção vacinas comerciais, as quais são utilizadas até hoje na avicultura (Lasher & Davis, 1997). A seleção de uma vacina descrita como suave ("mild field") foi um progresso na avicultura, a qual era propagada em embrião de galinha e deu origem às cepas Moulthrop (Lasher & Davis, 1997).

Outros pesquisadores também desenvolveram vacinas com estirpes adaptados em fibroblastos de embrião de galinha (FEG) através de passagens cegas. Uma amostra derivada da amostra Edgar foi adaptada em diversos cultivos primários, primeiro em co-cultivo de células renais e da bursa, e finalmente foi relatada a primeira propagação do vírus numa linhagem celular contínua após várias passagens cegas em células Vero. (Lasher & Davis, 1997). Depois Lukert adaptou a mesma amostra em FEG. Esta vacina foi pouco utilizada e foi chamada de amostra "Lukert" e foram com seus derivados que se produziram as vacinas atuais (Lasher & Davis, 1997).

No Brasil, o primeiro diagnóstico da doença foi feito por Nakano *et al.* (1972) com a descrição anátomo patológica da doença. Depois Saukas, em 1978, isolou uma amostra 3036 que em aves suscetíveis, produzia lesões características da doença de Gumboro. A autora relatou que 68% de aves de granjas diferentes apresentaram anticorpos contra a doença demonstrando a disseminação nos plantéis brasileiros.

McFerran *et al.* (1980), foram os primeiros a relatar variação antigênica entre isolados do vírus da DIB de origem Européia, ao apresentarem evidências da presença de dois sorotipos 1 e 2. Estes resultados também foram encontrados nos Estados Unidos e os vírus foram designados sorotipo I e II (Jackwood *et al.*,1982). Estudos posteriores indicaram forte relação entre os isolados da Europa e da América do Norte e então, foi proposta para todas as amostras a designação de sorotipo 1 e 2 (McNulty *et al.*, 1988). Os dois sorotipos são diferenciados nos testes de vírus-neutralização (VN) e não são distinguíveis por imunofluorescência ou ELISA (Jackwood & Saif 1991).

No Brasil ainda não se relatou a ocorrência do segundo sorotipo em perus ou em frangos.

O controle da doença se complicou a partir de 1985, com o reconhecimento nos Estados Unidos de amostras variantes do sorotipo 1 que escapam da imunidade maternal contra amostras clássicas e diferem nas suas propriedades biológicas (Jackwood & Saif 1991).

Na Europa e em países da Ásia e do Oriente Médio não foram relatadas a ocorrência de vírus variantes como os observados nos EUA, porém muitos pesquisadores têm relatado desde esta época e até os dias de hoje, inclusive no Brasil, a presença de amostras muito virulentas mas que não são antigenicamente muito diferentes das amostras denominadas de "clássicas" presentes nas vacinas (Chettle *et al.*, 1989; Van Den Berg *et al.*, 1991; Tsukamoto *et al.*, 1992; Pitcovski *et al.*, 1998; Di Fábio *et al.*, 1999). Pesquisadores atribuem ao fato do aparecimento destas amostras às falhas de vacinação decorrentes da presença de anticorpos maternais (Chettle *et al.*, 1989; Van Den Berg & Meulemans, 1991).

A imunidade contra o vírus da DIB é mediada principalmente por anticorpos e pela imunidade passiva transferida aos pintos pelos anticorpos através do saco vitelino (Lukert & Saif, 1991). As aves reprodutoras são geralmente vacinadas com vacinas vivas ou com vacinas vivas e inativadas. Supõe-se

que pintos nascidos de aves imunizadas com vacinas inativadas apresentem concentrações tão altas de anticorpos que a imunização somente seria necessária depois de 4 semanas de idade ou não seria necessária (Van Den Berg & Meulemans, 1991). Por isso, alguns países não imunizavam seus plantéis na década de 1980 e outros utilizavam as vacinas oleosas. No início não ocorreram problemas, possivelmente pelo efeito das vacinas inativadas. Entretanto, a partir de 1986, começou a ocorrer muitas perdas em frangos de corte e depois em aves de postura devido à presença de amostras muito virulentas, inicialmente reportadas na Bélgica e mais tarde por toda a Europa (Chettle *et al.*, 1989; Van Den Berg *et al.*, 1991). Provavelmente a imunidade conferida pela vacina inativada não foi suficiente e as aves tinham a doença por volta de 4 semanas de idade. Para controlar a doença, frangos de corte com duas semanas de idade passaram a ser vacinados com vacinas vivas que tinham uma patogenicidade residual intermediária como as vacinas D-78 ou Bursine 2 (Mazariegos *et al.*, 1990). Entretanto, em granjas comerciais existe uma grande variação dos títulos de anticorpos em pintos de um dia, principalmente em lotes de aves recém-nascidas procedentes de matrizes diferentes mostrando algumas vezes lotes provenientes de matrizes vacinadas com vacina emulsionada, títulos muito baixos (Mazariegos *et al.*, 1990). Por isso é muito difícil determinar uma idade ideal para a vacinação. A falta de conhecimento sobre a dinâmica da diminuição dos títulos contribui para as falhas na vacinação (Tsukamoto *et al.*, 1995). Além disso, falhas na vacinação com vacinas intermediárias podem ser devido principalmente, à capacidade do vírus de campo de superar concentrações consideráveis de anticorpo maternal do que o vírus vacinal. Isto significa que numa situação de infecção forte o vírus de campo invade a granja muito antes do que qualquer vírus vacinal (Mazariegos *et al.*, 1990). Uma vez o vírus de campo está presente na granja depois do primeiro surto e especialmente quando a granja não foi desinfetada completamente, as aves nascidas com um baixo título de anticorpos maternais, depois

de alguns dias, vão disseminar o vírus de campo. Depois de alguns ciclos o vírus se encontra em concentrações muito altas na cama e logo é transmitido para outros pintos que tem níveis de anticorpos que podem ser sobrepujados pelo vírus de campo mas não pelo vírus vacinal que chega muito mais tarde. Por isto que pesquisadores resolveram usar vacinas mais virulentas (com patogenicidade residual) ou chamadas de "forte ou quente" como as vacinas "intermediárias plus". Não existe uma vacina que seja mais virulenta e ao mesmo tempo não seja patogênica.

Nos Estados Unidos a situação se mostrou diferente com o relato das amostras variantes em 1985 sendo que não foi relatada a presença de amostras altamente virulentas como verificado em outros países (Lukert & Saif, 1995).

Atualmente a Austrália é o único país, além dos EUA, a relatar a ocorrência de amostras variantes (Sapats & Ignjatovic, 2000) pela caracterização destes isolados verificou-se que são amostras diferentes das encontradas nos EUA e também das amostras encontradas na Europa.

1.2-Patogenia e sinais clínicos da doença de Gumboro

A doença de Gumboro ou doença infecciosa da bursa é uma enfermidade altamente contagiosa que, dependendo de vários fatores pode provocar imunossupressão permanente ou temporária associada ou não com sintomas clínicos e mortalidade. As variações das formas da doença ocorrem principalmente em função da idade ao momento da infecção (Skeeles *et al.*, 1979). Quanto mais precoce for a infecção, maior e irreversíveis serão os danos causados na bursa de Fabricius (BF), principal órgão alvo do vírus e com isso o processo de imunossupressão é permanente. As aves infectadas mais tardiamente já terão tido tempo para que os linfócitos B presentes nos folículos linfóides, migrem para outros órgãos, como o baço e com isso o processo de imunossupressão é

temporário (Lukert & Saif, 1997). A forma clínica da doença geralmente ocorre em aves entre 3 a 6 semanas de idade e dura cerca de 5 a 7 dias. Trata-se de doença aguda de pintos caracterizada por eriçamento das penas, diarréia aquosa, anorexia, depressão, tremores, severa prostração e finalmente morte. Em estágios avançados da doença, principalmente em aves mortas, nota-se alterações renais proeminentes. Estas lesões são provavelmente consequência da desidratação severa provocada pela doença. São observadas também hemorragias na coxa e musculatura esquelética. O órgão alvo do vírus é o tecido linfóide principalmente a BF, porém outros tecidos linfóides como, baço, timo, glândula de Harder, tonsilas cecais, também são afetados. As lesões da bursa caracterizam-se por edema gelatinoso seguido de intensa atrofia (Lukert & Saif, 1991; Sellers *et al.*, 1999).

A forma subclínica da doença ocorre em aves com idade inferior a 2 semanas, porém o único indício visual da infecção é o grau de atrofia da BF. A forma subclínica é bastante importante devido a sua relação com a perda de produtividade; isso porque os animais infectados tornam-se imunodeficientes ficando suscetíveis a outras enfermidades (Cao, *et al.*, 1998). Além disso, a infecção precoce pode diminuir a eficácia de vacinas contra outras doenças (Lukert & Saif, 1991).

A incidência da doença é alta e está distribuído pelo mundo todo principalmente nas áreas de produção avícola. A transmissão pode ocorrer pelo contato direto ou pela água, pelo ar, alimento e cama utilizada anteriormente por aves infectadas. Pelo contato direto, aves suscetíveis podem adquirir a doença até o 14° dia de infecção (Benton *et al.*, 1967; Vindegovel *et al.*, 1976), não se observando transmissão por esse meio após o 16° dia de inoculação (Winterfield *et al.*, 1972). O vírus pode ser eliminado pelas fezes a partir do 2° ao 10° dia após a inoculação, podendo permanecer nas fezes até 60 dias (Vindegovel *et al.*, 1976). Entretanto as aves não contraem a doença através dos excretos de aves infectadas (Benton *et al.*, 1967). Snedeker *et al.* (1967) obtiveram lesões

características da doença após inocular aves suscetíveis com suspensão de larvas de insetos, do *Alphitobios diaperinus* (Panz.), presentes na ração, coletadas na granja, oito semanas após um surto da doença. Entretanto, para Edgar & Cho (1965), o principal meio de transmissão da doença se dá por reservatórios e fômites.

1.3-Características gerais do IBDV

O vírus da doença infecciosa da bursa é também denominado de IBDV, do inglês "Infectious Bursal Disease Virus". Este vírus se replica nos linfócitos B imaturos da bursa, tendo como órgão alvo primário a bursa de Fabrícius.

O IBDV pertence ao gênero *Avibirnavirus* da família *Birnaviridae* cujo protótipo é o vírus da necrose pancreática infecciosa de peixes. Outros vírus deste grupo incluem, o vírus Tellina que infectam molusculos bivalves e o vírus X da D*rosófila* (Dobos *et al.*, 1979; Becht, 1981; Murphy *et al.*, 1995). Vírus deste grupo não apresentam envoltório, têm simetria icosaédrica, tamanho de aproximadamente 60nm de diâmetro e o genoma apresenta dois segmentos de fita dupla de RNA (Becht, 1981; Lombardo *et al.*, 1999; Schröder, *et al*, 2000). Existem dois sorotipos o 1 e o 2. Como o sorotipo 2 não tem habilidade de induzir lesões na bursa, somente o sorotipo 1 é patogênico para aves suscetíveis (Ismail *et al*, 1988). O motivo destas diferenças nas propriedades biológicas ainda não é conhecido.

O genoma do vírus é constituído de dois segmentos A e B, sendo o segmento A maior (PM de $2,5 \times 10^6$) que o B (PM de $2,2 \times 10^6$). O segmento menor do genoma do vírus, codifica a proteína de 95 kDa, a VP1 que tem atividade de RNA polimerase dependente de RNA e é responsável pela replicação do genoma (Pitcovski *et al.*,1998; Lombardo *et al.*, 1999). O segmento maior apresenta duas estruturas de leitura aberta "ORF" que estão parcialmente sobrepostas. A primeira estrutura codifica um

polipeptídeo de 17 kDa denominado de VP5. A expressão da VP5 é importante na indução da patogenicidade do vírus, uma vez que mutantes $VP5^{-}$ em sorotipo 1, não são capazes de induzir lesões na Bursa (Yao *et al.*, 1998). A VP5 foi constatada tanto em células da bursa de galinhas infectadas, como em células de fibroblasto de embrião de galinha (FEG) infectadas (Schröder, *et al.*, 2000). A segunda estrutura codifica uma poliproteína de 106 kDa (que inclui os precursores de VP2, VP4 e VP3), onde a VP4 é responsável pela maturação proteolítica da própria poliproteína que por clivagem autocatalítica forma três polipeptídeos pré-VP2, VP3, VP4 (Lombardo *et al.*, 1999). A pré-VP2 sofre um segundo processamento independente e muito lento, produzindo o polipeptídeo conhecido como VP2. Esta clivagem é incompleta, pois ambas proteínas pré-VP2 e VP2, juntamente com a VP3 formam o capsídeo do vírus (Sanchez & Rodriguez, 1999).

O ciclo de replicação foi estudado em células de fibroblasto de embrião de galinha com uma adsorção máxima de 75 minutos, período de latência de 4 a 6 horas e duração de 10 a 36 horas (Lukert & Davis, 1974; Nick, *et* al.,1976; Kibenge *et al.*, 1988). Em células Vero e BGM-70 o ciclo é mais longo, de 48 horas (Jackwood *et al.*, 1987). Os polipeptídeos virais em células da bursa infectadas são detectados no meio de cultura após 90 min. a 6 horas pós-inoculação.(Müller & Becht, 1982). Muito pouco se sabe sobre o sítio de reconhecimento do receptor celular sobre o vírus e do mecanismo da síntese do RNA viral.

1.4- Características antigênicas do IBDV

A VP2 é a principal proteína imunogênica do vírus e o antígeno que especifica o sorotipo do IBDV, além de conter os epítopos neutralizantes. Apesar da VP3 tomar parte do capsídeo viral, anticorpos anti-VP3 não neutralizam a infectividade do vírus. O vírus possui de dois a três sítios

antigênicos intimamente relacionados e capazes de induzir anticorpos neutralizantes em aves. O principal epítopo neutralizante da VP2 depende da sua conformação e configuração e se localiza em uma região que apresenta muita variabilidade entre os sorotipos 1. Pequenas modificações nesta região podem provocar alterações nas propriedades antigênicas do vírus (Dybing & Jackwood, 1998). Isto pode alterar a estrutura de um epítopo ou induzir a perda do mesmo. Estudos utilizando diferentes anticorpos monoclonais neutralizantes tem sido empregados em testes de ELISA de captação de antígeno, permitindo estabelecer perfis antigênicos dos vírus, tanto selvagens como vacinais, possibilitando uma classificação dos mesmos (Hassan *et al.*, 1996). Estas alterações também são estudadas tentando correlacionar a sequência de aminoácidos codificada pelo genoma viral e a antigenicidade. Dormitorio et al. (1997) observaram que a substituição do aminoácido prolina pela treonina na região 222 da VP2, pode induzir a perda de um epítopo e consequentemente a diminuição da neutralização por anticorpos.

Os vírus do sorotipo 1 apresentam inúmeras variações antigênicas que só foram detectadas a partir de 1985 nos EUA. Essas amostras foram estudadas realizando-se testes de virus-neutralização cruzada, a partir dos quais foram identificados 6 subtipos do sorotipo 1 (Jackwood & Saif, 1987; Ismail & Saif,1991). Segundo Jackwood & Jackwood (1994), a existência de diversos subtipos tem diminuído a eficiência da imunidade maternal e de alguns programas de vacinação, por não apresentarem imunidade cruzada entre si. Jackwood & Jackwood (1997) também observaram que quando a vacinação é realizada contra apenas um dos subtipos do sorotipo 1, as aves não se mostram protegidas, ou seja, a vacinação com apenas um subtipo antigênico não é capaz de conferir proteção contra subtipos heterólogos.

Em meados da década de 1980 na Europa foram descritos os primeiros surtos da doença

causada por amostras de vírus muito virulentos (vvIBDV). Desde então, essas amostras foram identificadas e caracterizadas em muitas partes do mundo como na Europa (Van Den Berg *et al.*, 1991; Brown, *et al.*, 1994; Zierenberg, *et al.*, 2000), Japão (Nunoya, *et al.*, 1992; Tsukamoto, *et al.*, 1992), Israel (Pitcovski, *et al.*, 1998), África (Zierenberg, *et al.*, 2000) e Austrália (Sapats & Ignjatovic, 2000).

No Brasil em 1999, foi relatada a existência de amostras virais semelhantes às amostras muito virulentas encontradas na Europa e em grande parte do mundo. Através de estudos utilizando anticorpos monoclonais em ELISA de captura e análise molecular por RT/PCR e sequênciamento do produto, foi observado que esses vírus apresentam propriedades antigênicas, genéticas e patogênicas das amostras de vvIBDV encontradas na Europa (Di Fabio *et al.*, 1999). Este vírus foi primeiro relatado em granjas situadas na região de Campinas, onde as taxas de mortalidade variaram de 5 a 20%. As aves afetadas exibiram penas eriçadas, prostração, diarréia e morte. A necrópsia mostrava edema gelatinoso típico na BF que apresentava aspecto escurecido. As aves também apresentavam hemorragias musculares e petéquias, desidratação e aumento dos rins (Di Fabio *et al.*, 1999). A vacinação repetida com vacina intermediária ou suave por 1, 10 e 18 dias apresentou pouca eficácia. Os lotes subseqüentes de aves, apresentaram a doença pois a cama permanecia contaminada (Di Fabio *et al.*, 1999). Estas amostras ainda não foram isoladas e adaptadas em culturas celulares, bem como, utilizadas para a produção de novas vacinas.

1.5-Isolamento e propagação do IBDV

O método tradicional de isolamento do vírus é feito em membrana corion alantóide (MCA) de ovos embrionados de galinha (Winterfield *et al.*, 1972; Lukert & Saif, 1991). O isolamento do IBDV *in vitro* é muito difícil e trabalhoso. Geralmente emprega-se cultura celular primária de embrião de

galinha de 9 a 11 dias de idade (Kibenge & McKenna 1992). Uma vez isolado o vírus pode ser adaptado para propagação em linhagens celulares contínuas (Reddy & Silim, 1991). Nessas culturas o vírus produz efeito citopático característico, isto é efeito degenerativo ou arredondamento das células. Amostras patogênicas não são facilmente adaptadas em cultivo celular primário, pois necessitam de diversas passagens ou requerem sucessivas passagens em MCA bem como em saco vitelino (Hassan *et al.*, 1996). Estas amostras apresentam patogenicidade reduzida *in vivo* (Yamaguchi *et al.*, 1996) e além disso, muitos isolados não crescem em culturas primárias (Mc Ferran 1980).

Com a finalidade de estabelecer um sistema seguro de propagação do vírus, em 1987, Jackwood e colaboradores, propagaram amostras de IBDV vacinais e de campo, previamente adaptadas em cultivo primário de embrião de galinha, em linhagens celulares provenientes de rim de macaco: MA-104, Vero e BGM-70. As amostras de vírus se replicaram nas três linhagens, sendo que o efeito citopático foi pronunciado na linhagem BGM-70. Também foram feitos experimentos de vírus neutralização nas células BGM-70. Os resultados foram semelhantes aos obtidos em cultivos primários de embriões de galinha.

Além de Jackwood *et al.* (1987), poucos trabalhos relatam a utilização de linhagens celulares contínuas de mamíferos para a replicação do IBDV e na utilização em testes rotineiros de diagnóstico (Cowen & Braune 1988; Kibenge & McKenna 1992). O uso de linhagens celulares contínuas no isolamento e propagação de vírus aviários apresenta uma série de vantagens sobre o uso de culturas primárias de células de embrião de galinha. As linhagens celulares contínuas são facilmente disponíveis e mantidas por procedimentos técnicos simples, enquanto que a preparação das culturas primárias é muito mais trabalhosa e a disponibilidade de ovos isentos de patógenos é muito reduzida. No Brasil são poucos os laboratórios que produzem estes ovos. Além disso, as culturas primárias constituem uma

população mais heterogênea do que as linhagens celulares (Frederic *et al.*, 1992).

A utilização de linhagens celulares estabelecidas para produção de vacinas contra o IBDV ainda é limitada, pois a maioria das vacinas inativadas é produzida em BF ou as vivas atenuadas em ovos embrionados ou em FEG (Müller, 1992).

Um outro fator a ser levado em conta é que, durante o isolamento do IBDV a partir da bursa, devido à proximidade da cloaca, pode ocorrer contaminação do material coletado por outros vírus. Amostras não patogênicas de reovírus geralmente estão presentes em aves normais podendo ser isolados destas (Robertson, & Wilcox, 1986). Além disso, a ave pode apresentar infecção mista na BF podendo estar presentes reovírus e IBDV e, ao invés do isolamento de IBDV, ocorre o isolamento de reovírus. Autores relatam que é possível utilizar determinadas culturas celulares para separar estes dois vírus (Gelenczei & Lunger, 1970). Portanto seria interessante utilizar uma linhagem celular pouco suscetível ao reovirus ao invés da cultura primária de embrião de galinha que é suscetível tanto ao reovirus e quanto ao IBDV.

2. OBJETIVOS

Este trabalho foi realizado com a finalidade de investigar sistemas celulares suscetíveis ao vírus da doença infecciosa da bursa que apresentassem efeito citopático evidente para utilização em testes de vírus neutralização tendo como objetivos:

- Estudar a suscetibilidade das diferentes linhagens celulares contínuas: CER, Vero, SK-6, IBRS-2 clone D-10, RK-13, BHK-21 clone 13, à amostras vacinais de IBDV e aquelas obtidas de materiais clínicos de aves com suspeita de doença infecciosa da bursa;

- Escolher dentre as diferentes linhagens celulares suscetíveis a que melhor propaga o vírus;

- Escolher dentre as linhagens suscetíveis uma que seja pouco ou não suscetível ao reovírus;

- Avaliar a utilização da linhagem celular suscetível para ser empregada em testes de vírus-neutralização.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Culturas celulares

3.1.1. Cultura primária

Foram utilizadas células de fibroblastos (FEG) obtidas de ovos embrionados de galinha de 9 a 11 dias de incubação, isentos de patógenos, provenientes do laboratório BIO-VET. As culturas foram preparadas seguindo metodologia usual (Rosenberg *et al.*, 1974), com algumas modificações como descrito a seguir. Os ovos embrionados foram desinfetados em solução de álcool 70° e abertos pela câmara de ar. Em seguida, retirando-se a cabeça, asas e patas, os embriões foram colocados em um Becker contendo solução de tripsina citratada (fornecida pelo BIO-VET) e deixados em temperatura ambiente por duas horas. Após este período, a suspensão contendo o tecido foi submetida à dispersão mecânica com o auxílio de uma seringa hipodérmica. Em seguida foi filtrada, centrifugada durante 10 min. a 700 x g e após a retirada do sobrenadante, acrescentou-se ao sedimento, meio mínimo essencial de Eagle (MEM), contendo de 8% de soro fetal bovino (SFB) Cultilab®, inativado a 56° C por 30 min. Após a homogeneização do sedimento realizou-se a contagem celular e distribuição das mesmas.

3.1.2. Linhagens celulares

As linhagens celulares contínuas empregadas foram obtidas das seguintes espécies animais: embrião de galinha, CER (chicken embryo related) (SMITH *et al.*, 1977); de macaco: linhagem celular Vero ("African green monkey kidney"-ATCC-CCL 81); rim de suíno: SK-6 ("swine kidney") e IB-RS-2 clone D-10 (Instituto Biológico-rim suíno-2 ATCC-CRL 1835); rim de coelho: RK-13 (rabbit kidney – ATCC-CCL 37), rim de hamster: BHK-21 clone 13 (baby hamster kidney ATCC-CCL 10). Todas as culturas celulares foram mantidas nas mesmas condições seguindo metodologia usual (FERNANDES

& SIMONI, 1995) e cultivadas em MEM acrescido de 8% ou 10 % de SFB. Nos experimentos de vírus neutralização o meio utilizado foi o mesmo, tanto para as células RK-13 como para as culturas primárias, este meio foi cedido pelo BIO-VET.

QUADRO 1: Relação das amostras do IBDV de vacinas utilizadas, relacionadas de acordo com código adotado no laboratório e sua procedência

CÓDIGO	TIPO	PROCEDÊNCIA
GBV	Gumboro cepa G-8	BIO-VET
A	Amostra D-78	Malinckrodt
B	cepa forte, G603	Malinckrodt
C	Amostra Lukert	Malinckrodt
D	Amostra intermediária	Malinckrodt
G6	cepa Moulthrop G 606	Malinckrodt
B7	Bur S-706	Fort Dodge
B2	Bursine 2	Fort Dodge
BP	Bursine Plus	Fort Dodge
G2	228E	Intervet

3.2. Amostras virais

Foram utilizadas amostras de IBDV de vacinas (quadro 1) e de campo (quadro 2), e também a amostra de reovírus estirpe S1133 (Robertson & Wilcox, 1986).

3.2.1 Vacinas

As vacinas GBV, G6, B7, B2, BP e G2, liofilizadas, foram diluidas em 1 mL de MEM e as vacinas A, B, C e D já estavam diluídas. Todas as vacinas foram estocadas em freezer –20°C.

3.2.2. Amostras de campo

O material utilizado neste trabalho foi coletado segundo o método descrito a seguir. Dez aves aleatoriamente escolhidas de lotes problema, de diferentes regiões do Brasil, foram sacrificadas, necropsiadas e as bursas foram coletadas e mantidas a –70° C até o momento do uso. No quadro 2 estão relacionadas as amostras suspeitas na forma de suspensões de membranas corion alantóides (grupos de 1 a 4) ou de bursa (grupo 5 e 6). As amostras do grupo 1 foram cedidas pelo Laboratório de Ornitopatologia da Faculdade de Medicina Veterinária da USP, as amostras dos grupos 2, 3, 4 de procedências diferentes foram cedidas pela Dra Clarice Weis Arns e as amostras do grupo 5 e 6, cedidas pelos laboratórios de Patologia Avícola de Bastos e de Descalvado, ambos do Instituto Biológico. As amostras do grupo 5 foram coletadas de aves de postura o restante de aves de corte. As amostras de procedência 1, 2, 3 e 4 o número de passagens anteriores ao recebimento das amostras não foi informado.

QUADRO 2- Relação das amostras de campo agrupadas de acordo com código adotado no laboratório

CÓDIGO	PROCEDÊNCIA	TIPO
E, F, G, H, Q e AI, AK, AP*	1	MCA
I, J, L, M, N, O, P, R, T, X e Y	2	MCA
AA, AB, AC, AD, AE,	3	MCA
AF, AG, AH, AJ	4	MCA
BA, BB, BC, BD, BE, BF	5	Bursa
BG, BH, BI, BJ, BK, BL, BM, BN, BO	6	Bursa

*a amostra AP foi proveniente de bursas de aves suspeitas.

3.3. Inoculação viral

3.3.1. Inoculação *in vivo*

Para o isolamento viral em ovos embrionados, as bursas foram maceradas, diluídas em solução salina de Hanks contendo 2% dos antibióticos, penicilina e estreptomicina (1x 10^6 UI/mL e 2mg/mL) e centrifugadas durante 15 minutos a 2500 x g. As amostras de bursa foram também tratadas com igual volume de clorofórmio. Os sobrenadantes foram coletados e filtrados em membrana com porosidade de 0,45 μm antes da inoculação nos ovos embrionados SPF com 10 a 12 dias de incubação. Para tanto, esses ovos no 10º dia de incubação, após a visualização do embrião por ovoscopia e a localização da câmara de ar, da MCA e dos vasos sanguíneos, foram marcados na casca. Feito isso, inoculou-se

através de um orifício feito na casca no pólo da câmara de ar, e com uma seringa inclinou-se a agulha até a marca feita nos ovos. Em seguida o orifício foi vedado com cola escolar. Procedeu-se a inoculação em pelo menos 5 ovos para cada amostra suspeita. Acompanhou-se os ovos até 9 dias pós-inoculação em incubadora marca CASP com viragem automática dos ovos e umidade controlada, sendo que aqueles que morriam no decorrer do período, salvo aqueles mortos após 24 h decorrente de erros no momento da inoculação, foram abertos e as lesões observadas. Em seguida, o efeito da inoculação viral foi avaliado nestes ovos através da verificação de mortalidade (3 a 5 dias pós inoculação) e/ou presença de lesões características como fígado de coloração verde ou mosqueado, esplenomegalia, rim aumentado e coração pálido.

Os embriões que não apresentaram mortalidade até o 18º dia de incubação foram sacrificados e necropsiados para também, verificar-se as lesões. Cuidadosamente, as MCAs foram retiradas dos ovos embrionados e congeladas. No momento do uso foram novamente maceradas, centrifugadas, filtradas e inoculadas em novos embriões. Na ausência de lesões e/ou mortalidade, foram realizadas pelo menos três passagens cegas. Após a inoculação *in vivo*, as suspensões de MCA foram então utilizadas na propagação em células, ou seja *in vitro*.

3.3.2. Inoculação *in vitro*

Monocamadas celulares contendo $1x10^5$ células/mL (número de células suficiente para formar monocamada confluente para as linhagens contínuas) ou 3×10^5 células/mL (número de células suficiente para formar monocamada confluente para as culturas primárias) cultivados em microplacas de 24 cavidades foram inoculados com 0,01 a 0,03 mL da suspensão viral e incubadas durante pelo menos 96 h a 37° C em estufa com atmosfera controlada com 5% de CO_2 para a observação de efeito citopático (ECP). Em seguida as suspensões de células infectadas foram congeladas e descongeladas

três vezes, e centrifugadas por 20 min. a 2500 x g. O sobrenadante foi coletado, distribuído em vários tubos, armazenados a –20° C para serem inoculados em novas monocamadas celulares.

Inicialmente todas as amostras foram inoculadas nas células FEG, e foram realizadas passagens até o aparecimento do ECP ou pelo menos três passagens cegas, sendo que o ECP das amostras suspeitas foi comparado com o ECP das amostras vacinais obtidas em células FEG. As que apresentaram ECP em FEG foram então inoculadas nas linhagens celulares RK-13 e CER. Posteriormente o trabalho foi ampliado com a utilização de outras linhagens celulares para a comparação da suscetibilidade destas linhagens ao IBDV e também ao reovirus. As amostras consideradas negativas em FEG não foram propagadas nas linhagens contínuas e as que causaram ECP em FEG foram utilizadas para a identificação viral descrita nos itens 3.6 e 3.8.

3.4. Titulação viral

Após a obtenção do ECP característico, a suspensão viral foi titulada em células cultivadas em microplacas de 96 cavidades (3×10^5 células/mL para a linhagem contínua ou 8×10^5 células/mL para a cultura primária). Foram feitas diluições seriadas iniciando-se pela diluição 10^{-1} até 10^{-9}. Essas diluições foram preparadas em MEM sem soro e foram inoculadas 50 µL de cada diluição nas microplacas. As células foram incubadas a 37° C durante 5 dias em estufa com atmosfera controlada com 5% de CO_2. Diariamente realizou-se acompanhamento da ocorrência de ECP examinadas ao microscópio invertido. O título viral foi calculado através da Dose Infectante de Cultura de Células 50% (DICC50%) definido pelo método de Reed & Muench (1938). Os experimentos foram repetidos pelo menos 3 vezes e calculados as médias para cada amostra viral.

3.5. Soros hiperimunes

3.5.1 Antígeno viral

O antígeno viral foi obtido como descrito a seguir. Monocamadas celulares infectadas produzidas em garrafas de 75 cm^2 foram congeladas e descongeladas por três vezes em freezer – 20°C, depois foram clarificadas por centrifugação a 11.000 x g em centrifuga Sorval rotor SA300, durante 30 min. para a retirada dos restos celulares. Os sobrenadantes, produzidos a partir de um volume inicial de 30 mL contendo vírus e meio de cultivo, foram homogeneizados com igual volume de triclorotrifluoretano (freon) e centrifugados a 9000 x g por 10 min. para retirada de lipídeos. A suspensão viral foi dividida em dois tubos e, ou foi congelada ou emulsificada (2 mL) com igual volume de adjuvante completo de Freund para a imunização inicial dos coelhos. A segunda dose imunizante foi realizada através da inoculação de suspensão viral (4 mL) emulsificada em adjuvante incompleto de Freund.

3.5.2 Produção do soro

Antes da imunização os coelhos foram sangrados para coleta do soro negativo. A primo imunização foi efetuada pela injeção de suspensão viral em adjuvante de Freund completo pela via intramuscular. Após 4 semanas, a suspensão viral emulsificada em adjuvante de Freund incompleto foi inoculada pela via intraperitoneal. Os animais foram sangrados por punção cardíaca 7 dias após a segunda inoculação.

Os soros coletados foram centrifugados por 10 min. a 2500 x g. Os sobrenadantes foram coletados e inativados durante 30 min. a 56°C e mantidos a –20°C até o momento do uso.

3.6. Teste de vírus neutralização recíproco

Utilizou-se o método β nos testes de VN, isto é, diluição de vírus constante e anticorpo em diferentes diluições, como descrito anteriormente por outros autores (Giambrone, 1980; Jackwood *et al.*, 1982). O teste foi realizado para comparar os resultados obtidos no teste de VN em culturas primárias com os resultados obtidos com a linhagem celular suscetível às amostras vacinais e de campo. Em microplacas de 96 cavidades foram depositados em cada cavidade 50μL de MEM e na primeira coluna 50μL de soro hiperimune, para ser feita a diluição seriada até a oitava coluna, passando 50μL de uma cavidade para a outra. Soros controle positivo e negativo foram sempre incluídos no experimento. Em seguida, 50μL de 100 $DICC_{50\%}$ de suspensão viral foram acrescentados nas colunas de 1 a 8 e após a incubação por 1 h em atmosfera de 5% de CO_2, as suspensões de células (3×10^5 células/mL para a linhagem contínua ou 8×10^5 células/mL para a cultura primária) foram adicionadas nas placas. Nas colunas de 9 a 12 foram adicionadas diferentes diluições do vírus que foi titulado para se averiguar se a dose utilizada correspondia à dose necessária. As placas foram incubadas a 37°C em estufa com uma atmosfera de 5% de CO_2 até 10 dias para a constatação ou não do efeito citopático e consequentemente da ocorrência ou não de neutralização. Foram utilizados os soros hiperimunes produzidos em coelhos a partir das amostras virais A, B, C, G6, B7, AC e AF e o soro GBV-8 produzido em galinhas e fornecido pelo BIO-VET.

3.7 Inoculação experimental de mistura de Reovírus e IBDV em RK-13 e em CER

As amostras S1133 de reovírus ($10^{7,5}$ $DICC_{50/50\mu L}$) e GBV ($10^{6,7}$ $DICC_{50/50\mu L}$) foram misturadas em partes iguais (R+G = RG) e inoculadas em células RK-13. Controles positivos foi feito

pela inoculação separada da amostra de reovírus e da amostra GBV nestas mesmas células, bem como, controle negativo com células não inoculadas. Foram realizadas duas passagens, com monitoramento do ECP por meio de microscópio invertido e em seguida, as amostras foram processadas e distribuídas em alíquotas para a detecção de ácido nucléico ou inoculação em células CER para a eventual verificação ou não do ECP.

3.8. Eletroforese em gel de Poliacrilamida

A eletroforese foi feita segundo técnica de Laemmli (1970), com algumas modificações.

3.8.1. Extração do ácido nucleico

A extração do ácido nucleico foi realizada a partir de culturas celulares infectadas (amostras vacinais e dos grupos 1, 2, 3, e 4) ou de bursa de aves suspeitas dos grupos 5 e 6 (preparadas de acordo com o item 3.3.1). Esta técnica foi empregada conforme o descrito por Herrings *et al.* (1982), com algumas modificações. Em microtubos contendo 400µL das suspensões virais, foram adicionados 100µL de uma solução de dodecilsulfato de sódio (SDS) a 10% e incubou-se em banho-maria a 37° C por 30 min. A seguir foi adicionado em cada microtubo, 250µL de reagente TRIzol® (Gibco-BRL) e 250µL de clorofórmio. Esta mistura permaneceu à temperatura ambiente por 15 min., agitada em intervalos 5 min., e em seguida foi centrifugada a 13.520 x g por 10 min. A fase aquosa resultante foi coletada e transferida para novos microtubos contendo 50µL de uma solução de NaCl a 20% e em seguida foi adicionado 1,0 mL de etanol gelado a cada tubo, homogeneizando-se. Este material foi mantido a –20° C, por uma noite, e depois centrifugado a 14000 x g por 20 min. Os sobrenadantes foram desprezados e os microtubos invertidos sobre papel de filtro para secagem total. Os sedimentos foram ressuspensos em 40µL de uma solução dissociadora contendo SDS 10%, Tris/HCl a pH 6,8,

mercaptoetanol, glicerina e azul de bromofenol (Laemmli, 1970) e incubados a 37° C por 30 min. em banho-maria. Esta mistura permanece viável por até 1 semana em geladeira.

3.8.2. Preparo do gel e corrida eletroforética

Após montagem e fixação de duas placas de vidro de 14,5 x 16,5cm com os respectivos espaçadores, para obtenção de um gel de 1 mm de espessura, e vedação das mesmas com ágar 2%, foi adicionado o gel separador de acrilamida-bisacrilamida 7,5%. Após a polimerização, o gel concentrador a 3,5% foi adicionado e imediatamente colocado um pente para formação posterior dos espaços, onde serão adicionadas as amostras (Pereira, *et al.*, 1983).

Após a polimerização deste segundo gel, as placas foram fixadas na cuba para a corrida eletroforética e vedado o contacto das placas com esta cuba com agar 2%. O tampão de corrida, Tris 0,025 M/Glicina 0,192 M pH 8,3, foi adicionado e o pente retirado cuidadosamente para obtenção das 15 canaletas. As amostras (40μL) foram aplicadas com a ajuda de uma microseringa ou micropipeta. O RNA do Reovírus S1133 e amostras vacinais de IBDV foram incluídos em todas corridas eletroforéticas como controle e padrão. Nas canaletas onde as amostras virais não foram aplicadas, foram adicionados 40μL da solução dissociadora.

A corrida eletroforética foi feita em corrente de 10 mA durante 18 a 23 horas à 4°C.

3.8.3. Coloração do gel

A coloração do gel foi feita com nitrato de prata segundo método de Herrings *et al.* (1982) com algumas modificações. Após o término da corrida, o gel foi transferido da placa para um recipiente onde se realizaram todos os passos da coloração, sem contato manual e com agitações periódicas. Primeiro, o gel foi lavado três vezes com água destilada depois foi fixado por 30 min, em 200 mL de uma solução contendo 10% de etanol e 0,5% de ácido acético. Esta solução foi retirada, o gel foi

novamente lavado e em seguida foi adicionada 200 mL de uma solução de nitrato de prata 0,011 M, por 30 min. Esta solução também foi retirada e o gel lavado como anteriormente. Depois, foi colocado 250 mL de solução reveladora, contendo NaOH 0,75 M e formaldeído 0,25 M. Quando do aparecimento dos segmentos de RNA, esta solução foi retirada, o gel lavado e foi adicionado 200 mL de uma solução de ácido acético a 5% para interromper a reação. A solução de ácido acético foi retirada e uma solução de etanol a 10% foi adicionada para conservação do gel.

3.8.4. Preservação do gel

Para preservação do gel, o mesmo pode ser seco pelo método descrito por Juang *et al.* (1984). Após a coloração, o gel foi lavado e uma solução contendo metanol 65% e glicerol a 0,5% foi adicionada permanecendo de 3 a 4 h até que o gel atinja 3/4 do seu tamanho. Duas folhas de papel celofane foram molhadas nesta solução. Uma placa de vidro foi envolta por uma das folhas de celofane, dobrando-se as bordas laterais desta por baixo da placa, evitando bolhas de ar ou rugas. A seguir, o gel foi colocado sobre o celofane na placa e com a outra folha, cobriu-se o gel retirando-se qualquer bolha de ar e envolvendo-o na placa como o procedimento anterior. O gel foi seco em estufa a 37° C de um dia para o outro.

4. RESULTADOS

4.1 Identificação das amostras pela detecção do RNA viral

O resultado das amostras submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) para detecção dos dois segmentos do RNA viral do IBDV mostrou que o primeiro segmento apresenta peso molecular de 2,5 x 10^6 e está situado no primeiro grupo de três bandas do reovírus S1133 e o segundo de PM de 2,2 x 10^6 entre o primeiro e segundo grupo das bandas presentes no reovírus e estão sumarizados nas figuras 1 e 2. Do total de 43 amostras de campo testadas, 40 % das amostras foram identificadas como IBDV e subdivididas em positivas (Tabela 7) e as negativas (Tabela 5 e 6) por não terem sido identificadas como IBDV (60% do total). Do grupo das negativas, 54% causaram ECP em FEG e destas, em 28,6% foi identificado os segmentos correspondentes ao RNA de reovírus. As demais não foram identificadas pela PAGE. As amostras do grupo 5 e 6, onde a identificação do IBDV foi feita diretamente a partir dos macerados da BF (item 3.8.1) e constituem 37% do total, em 40% foi detectado o genoma do IBDV e em 6,2% o do reovírus. Das amostras oriundas de MCA (63% do total) em 40% foi detectado o genoma do IBDV e em 14,3 % o do reovírus.

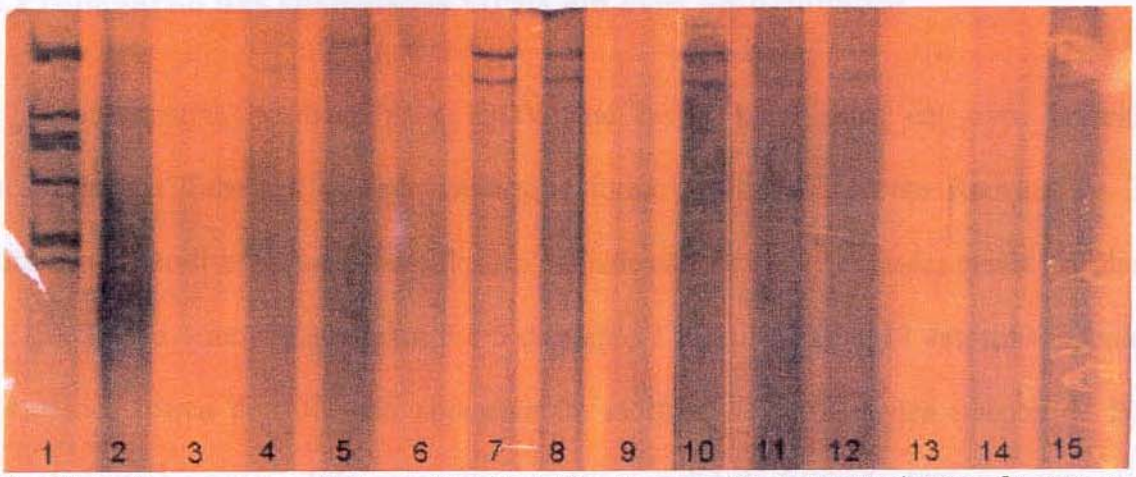


Figura 1: Eletroforese em gel de poliacrilamida de amostras provenientes de suspensões de culturas celulares primárias infectadas Linha: 1. Reovírus S1133; 2. B7; 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 15 amostras identificadas como IBDV e que causaram ECP em FEG; 3, 13 e 14 controles de células não inoculadas.

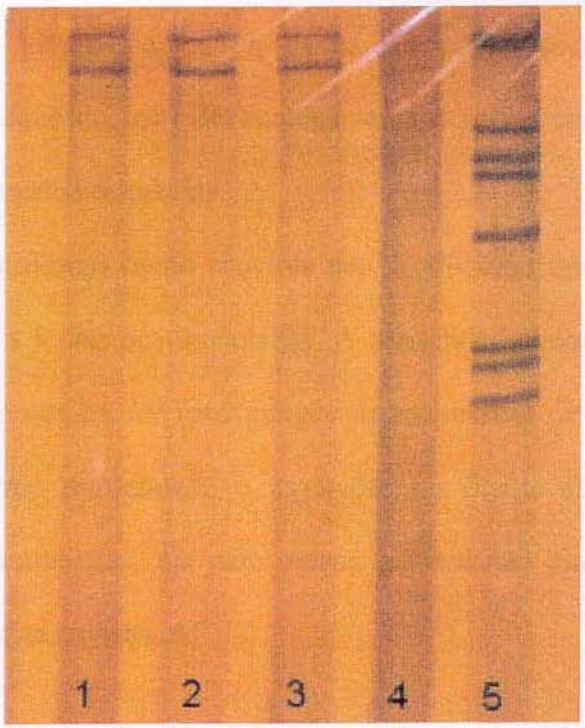


Figura 2: Eletroforese em gel de poliacrilamida de amostras provenientes de macerados da bursa de Fabrício. Linhas: 5. Reovírus S1133; 4. B7; 1 2 e 3. amostras de campo identificadas como IBDV proveniente de extração do RNA viral a partir de macerados da bursa.

4.2 Propagação das suspensões virais em ovos embrionados

As amostras positivas para IBDV que foram propagadas em ovos embrionados estão relacionadas na Tabela 1 e as amostras que foram identificadas como Reovírus na Tabela 2. As amostras que não tiveram uma identificação definida não foram relacionadas nestas Tabelas.

A Tabela 1 mostra que entre 3 a 5 dias após a inoculação das 17 amostras inoculadas em ovos embrionados, cerca de 20% não apresentaram mortalidade, 40% pouca (menos de 20% dos ovos mortos/amostra) e outros 40% apresentaram alta mortalidade (mais de 40% de ovos mortos/amostra). No grupo onde a mortalidade foi maior, pelo menos em um embrião analisado, foi observado lesões no fígado com aspecto de nós moscada (mosqueado). No período restante, isto é de 6 dpi em diante, não ocorreu mortalidade em 44% das amostras (dados não mostrados). As lesões mais freqüentes foram fígado com aspecto mosqueado, rim de tamanho aumentado e coração pálido, respectivamente em 56%, 69% e 75% das amostras estudadas.

As amostras identificadas como reovírus não produziram mortalidade nos ovos de embrião de galinha no período de 3 a 5 dias pós-inoculação. A mortalidade ocorreu somente entre 6 a 8 dias pi, e foi baixa na amostra G e alta na AP (proveniente de suspensões de macerados da bursa). Em metade das amostras não ocorreu mortalidade e as lesões no fígado (fígado esverdeado e mosqueado) ocorreram com todas as amostras, em pelo menos um embrião inoculado, sendo que as lesões mais severas foram observadas na amostra AP.

Tabela 1: Mortalidade entre 3 a 5 dias após inoculação e padrão de lesão da última passagem em ovos embrionados de amostras identificadas como IBDV

Cód.	Passagem em MCA	M	Fígado Congesto	Fig. mos-queado	Espleno megalia	Rim aumen tado	Rim congesto	Coração Pálido
AA	3	2/8	*	1/2				1/2
AB	1	5/6	1/5	1/5		4/5	1/5	1/5
AC	5	0/8						
AF	3	1/9	1/1				1/1	
BA	3	5/7		1/5		3/5		3/5
BF	1	3/6	2/3	1/3	1/3	1/3	1/3	2/3
AD	5	0/8						
AE	3	1/8			1/1			1/1
AG	2	1/7				1/1	1/1	1/1
AH	2	1/8				1/1	1/1	
AI	4	0/10						
AJ	2	1/6				1/1	1/1	1/1
AK	4	1/9						
BH	2	2/4		1/2		2/2		1/2
BJ	2	3/5	1/3	1/3				
BO	2	2/5		2/2		1/2		1/2
BN	2	2/3		1/2			1/2	

* nos espaços vazios caracterizam-se por ausência de lesões nos ovos embrionados

Tabela 2: Mortalidade entre 6 a 8 dias após inoculação e padrão de lesões encontradas na última passagem em ovos embrionados das amostras identificadas como Reovírus

Cód.	Passagem em MCA	M	Hepato megalia	Fig. Cong.	Fig. esver.	Fígado mosquea -do	Espleno megalia	Baço pálido	Rim aumen tado	Rim Cong	Rim esver.	Cor. Pal.
E	>2	0/9S	3/9	*	4/9	3/9	3/9					
G	>1	1/6			1/5	3/5						
H	>1	0/6S	1/6	1/6	1/6	1/6			3/6	1/6		
AP	5	5/9		1/9	3/9	2/9	7/9	4/9	7/9	3/9	1/9	6/9

S= ovos embrionados sacrificados; * espaços vazios=ausência de lesões

4.2. Propagação de vírus em diferentes cultivos celulares

4.2.1- Propagação de amostras vacinais

A Tabela 3 mostra os resultados da suscetibilidade das linhagens celulares FEG, CER e RK-13 à amostras vacinais de IBDV, e caracteriza o tipo de ECP observado na cultura primária e nas linhagens contínuas. Pode-se observar que das 10 vacinas utilizadas a cultura primária foi suscetível em 100%, as células RK-13 em 80% e as células CER em 10% das amostras vacinais.

O efeito citopático nas culturas primárias se caracterizou por granulação, arredondamento e retração celular, seguido do aparecimento de espaços vazios na monocamada. Nas células CER o ECP foi caracterizado por arredondamento celular, sem retração celular. Nas células RK-13, todas amostras exibiram efeito citopático semelhante ao observado em FEG. Como mostra na figura 3, as células RK-13 inoculadas com a amostra A após 96 h, apresentam-se picnóticas (seta) com espaços vazios na monocamada.

A Tabela 4 apresenta resultados da suscetibilidade das diferentes linhagens celulares infectadas com as amostras vacinais A, B, C, D. As linhagens celulares mostraram diferentes graus de suscetibilidade frente a diferentes amostras vacinais, mas todas foram suscetíveis a pelo menos uma das amostras vacinais. As linhagens RK-13 e Vero apresentaram comportamento semelhante ao observado com a FEG com todas as amostras; a D-10 mostrou-se suscetível às amostras C e D; a CER à amostra D e a SK-6 às amostras A e B.

A análise estatística pelo teste t de student mostra diferença entre as células RK-13 e Vero somente quanto à intensidade máxima (IM) do aparecimento do ECP, a 95% de confiança para comparação unilateral. Quanto ao aparecimento do efeito citopático este se iniciou entre 24 e 48 h atingindo o seu máximo após 96 h de inoculação, fato este verificado em todas as culturas celulares.

Tabela 3: Resultado da inoculação de diferentes amostras de vacinas comerciais de IBDV em FEG e nas linhagens celulares CER e RK-13

	FEG			CER			RK-13		
Vacinas	Número de pass. em FEG	Intensidade max. do ECP	Tipo do efeito citopático	Número de pass. em CER	Intensidade max. do ECP	Tipo do efeito citopático	Número de pass. em RK13	Intensidade max. do ECP	Tipo do efeito citopático
A	3	++[a]	DEG[c]	5	-[b]		5	+++	DEG
B	3	++	DEG	6	-		3	+++	DEG
C	2	++++	DEG	6	-		3	++	DEG
D	2	++	DEG	4	++++	DEG	1	++	DEG
GBV	1	++++	DEG	5	-		2	+++	DEG
G6	1	++++	DEG	5	-		1	+++	DEG
B7	1	+++	DEG	5	-		4	++	DEG
B2	1	++++	DEG	5	-		1	++++	DEG
BP	1	++++	DEG	5	-		6	-	
G2	2	++++	DEG	5	-		6	-	

[a]Efeito citopático +, ++, +++ ou ++++, corresponde, respectivamente, à 25, 50, 75 ou 100% das células destruídas;
[b]- ECP negativo
[c] DEG efeito citopático degenerativo, caracterizado por retração, arredondamento e descolamento celular

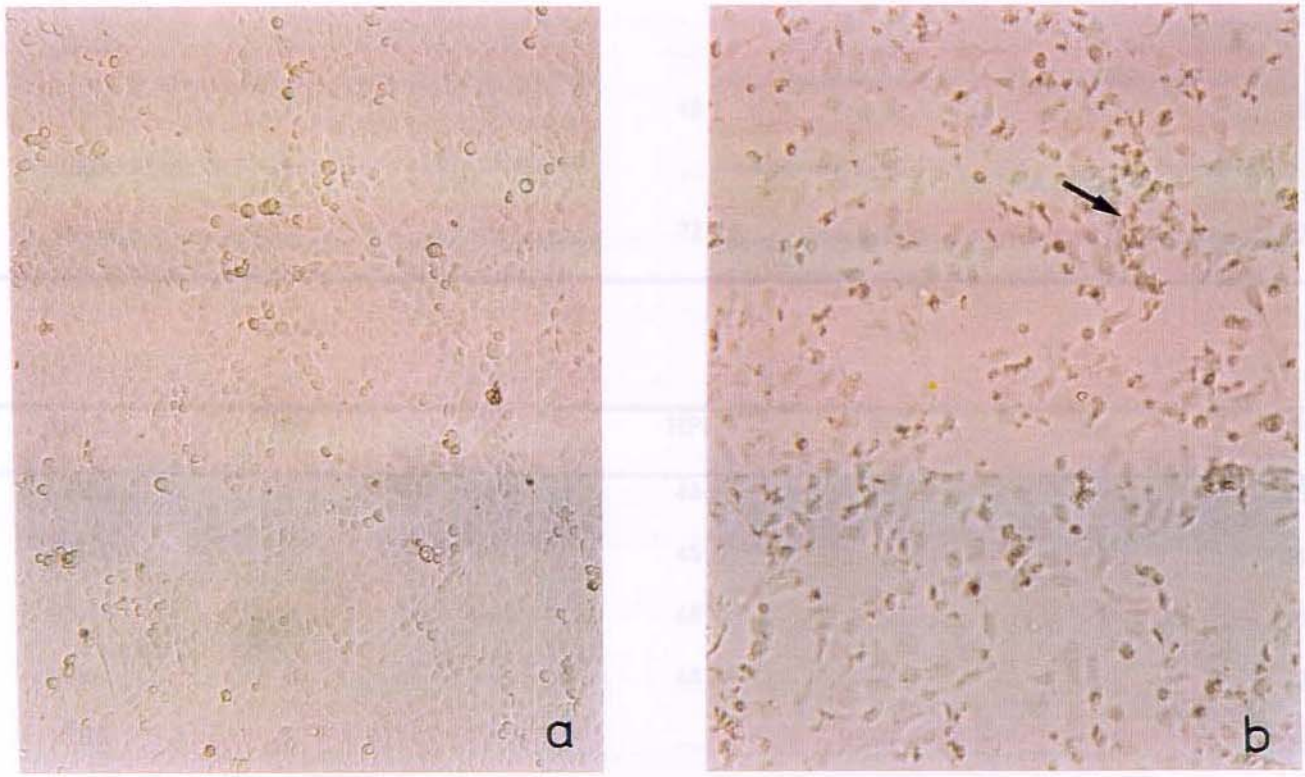


Figura 3: Linhagem celular RK-13: (a) não inoculada; (b) inoculada com a amostra A. As células após 72 horas de incubação a 37° C exibem efeito citopático degenerativo caracterizado por arredondamento e retração celular (setas). Aumento aproximado 100 vezes.

Tabela 4: Suscetibilidade de diferentes linhagens celulares a amostras vacinais de IBDV

	Amostra A			amostra B		
Células	NP**	IM***	HPI****	NP	IM	HPI
FEG	3	++*	48	3	++	48
RK-13	5	+++	24	3	+++	48
D-10	5	-	.....	5	-	.....
Vero	2	++	48	4	++	48
CER	5	-	.....	5	-	.....
SK-6	5	+	72	5	+	72

	Amostra C			amostra D		
Células	NP	IM	HPI	NP	IM	HPI
FEG	2	++++	48	2	++	48
RK-13	3	++	48	1	++	48
D-10	1	+++	48	1	++	48
Vero	4	++	48	4	+	72
CER	5	-	.....	4	++++	24
SK-6	5	-	.....	5	-	

*Efeito citopático com +, ++, +++ ou ++++, corresponde, respectivamente, a 25, 50, 75 ou 100% das células destruídas; -: ecp negativo.
**NP: número de passagens;
***IM: intensidade máxima do ECP;
****HPI: horas pós-inoculação em que se verifica o início do efeito citopático.

4.2.2- Propagação de amostras suspeitas de IBDV

Do total de 43 amostras de campo, 40% foram positivas para IBDV pela detecção de RNA viral como descrito no item 4.1. Das amostras positivas para IBDV, em 76,6% foi observado ECP tanto em FEG como em RK-13 e nenhuma em CER. Dos restantes 60% de amostras negativas para IBDV (item 4.1), em 54% foi observado ECP em FEG. Destas, em 57% foi observado ECP em CER e 21% em RK13, sendo que em 28,6% foi observado ECP característico do reovírus tanto em FEG como em CER e nenhum em RK-13.

Nas Tabelas 5, 6 e 7 estão relacionados os resultados das inoculações das amostras de campo suspeitas de IBDV e que causaram ECP em FEG. As Tabelas 5 e 6 apresentam os resultados obtidos com as amostras suspeitas e que não foram identificadas como IBDV nos testes de detecção do ácido nucléico viral por PAGE e nos testes de identificação sorológica por VN. Na Tabela 5 mostra os resultados das amostras propagadas em FEG, pode-se observar que 4 amostras mostraram ECP tipo degenerativo e as restantes, algumas exibiram ECP misto ou caracterizados pela formação de sincícios, degeneração e arredondamento das células, espaços vazios na monocamada e células gigantes flutuando no meio sobrenadante. O ECP das amostras identificadas como reovírus e propagadas na linhagem celular CER (Tabela 6) e denominado de SYN, foi semelhante ao observado em FEG. A Figura 4 mostra o ECP nas células CER infectadas com a amostra S1133, que foi caracterizado pela presença de células arredondadas ao lado das células gigantes (setas). A amostra Q apresentou ECP misto em células FEG, porém não se detectou RNA de reovírus, quando esta amostra foi propagada em CER exibindo ECP misto (SYN). A amostra AP até a 3ª passagem não exibiu ECP característico, porém, nas suspensões de células infectadas provenientes de passagens nesta linhagem, detectou-se o

RNA de reovírus. Nas células CER a amostra AP apresentou ECP em poucas células caracterizado por algumas células gigantes soltas no sobrenadante e o restante da monocamada semelhante ao controle, entretanto suspensões utilizadas para detecção de RNA viral confirmaram a presença de reovírus. Para todas as amostras que apresentaram ECP sincicial na CER não foi observado ECP nas células RK-13. Em apenas uma amostra que apresentou ECP tipo DEG em FEG (amostra T) apresentou ECP em ambas as linhagens celulares CER e RK-13.

A Tabela 7 apresenta os resultados obtidos com as amostras suspeitas e que foram confirmadas como IBDV nos testes de detecção do ácido nucléico viral por PAGE e nos testes de identificação sorológica por VN. Todas as amostras que exibiram ECP em células FEG apresentaram ECP característico nas células RK-13 sendo que 7 exibiram efeito citopático logo nas primeiras passagens (AA, AC, AF, AH, AI, BA, BF).

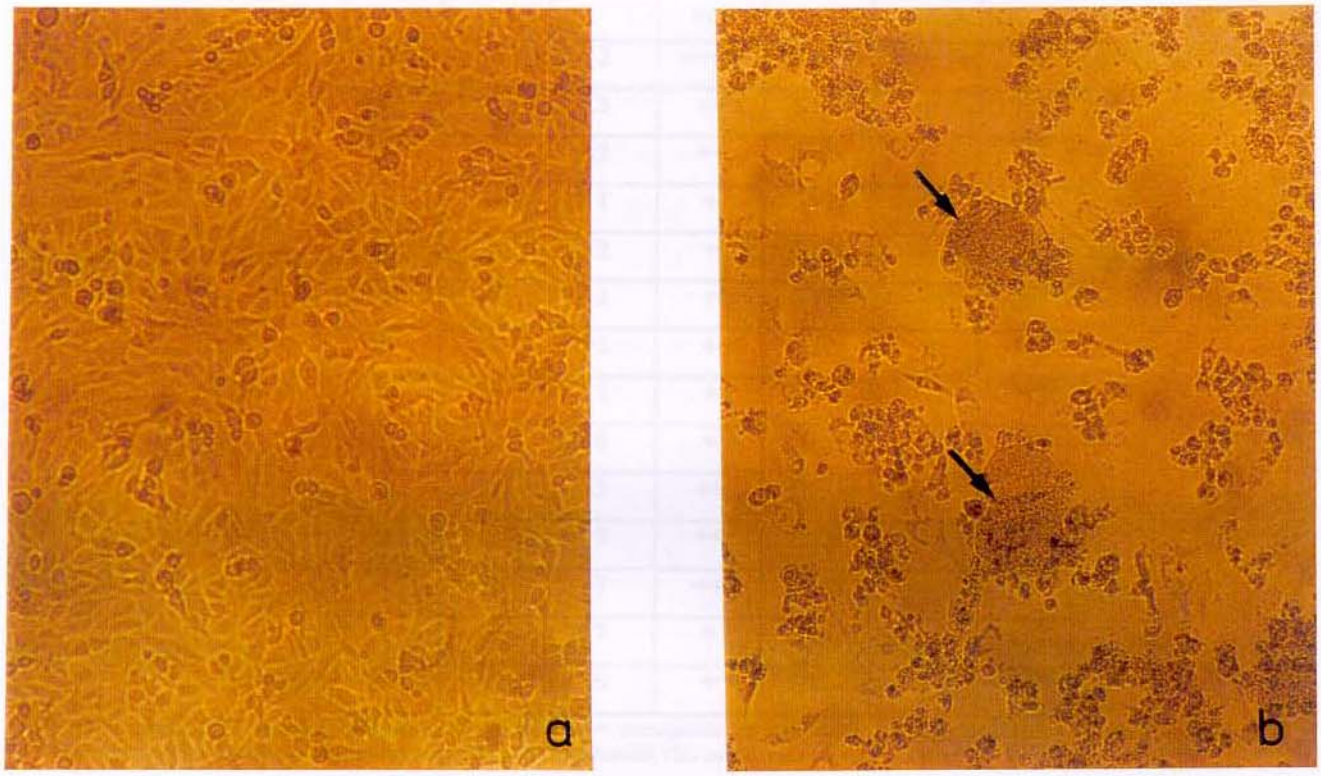


Figura 4: Linhagem celular CER: (a) não inoculada; (b) inoculada com a amostra S1133. As células, após 5 dias de incubação a 37° C, exibem efeito citopático caracterizado pela presença de células gigantes (setas). Aumento aproximado 160 vezes.

Tabela 5 – Resultado das inoculações de amostras suspeitas que exibiram ECP em FEG e que *não* foram identificadas por PAGE e VN como IBDV em FEG.

	FEG					
Amostra	Cultivo em OE	Número de pass. em FEG	Inten-sidade máx do ECP	Tipo do efeito citopático	Detecção de RNA de Reovírus	Vírus neutraliza ção
E	2	2	++++	SYN**	+	NT
G	1	3	++	SYN	+	NT
H	1	3	++	SYN	+	NT
I	4	1	+	SYN	-	NT
L	2	2	+	SYN	-	NT
M	3	3	+	SYN	-	NT
N	4	1	+	SYN	-	NT
O	4	1	+	SYN	-	NT
P	4	6	+	DEG	-	NT
Q	3	3	++	DEG	-	-
R	2	5	++	SYN	-	-
T	1	7	++	DEG	-	-
Y	1	7	+	DEG	-	-
AP	5	6	+	SYN	+	NT

*Efeito citopático (ECP) negativo ; ECP com +, ++, +++ ou ++++, corresponde, respectivamente, à 25, 50, 75 ou 100% das células destruídas;
**ECP degeneratigo: DEG; ECP sincicial ou misto: SYN;NT-não testado; OE- cultivo em ovos embrionados

Tabela 6 - Resultados das inoculações de amostras suspeitas que exibiram ECP em FEG e que *não* foram identificadas por PAGE e VN como IBDV, nas linhagens celulares CER e RK-13.

	CER				RK-13		
Amostra	Número de pass. em CER	Intensid. max. do ECP	Tipo do efeito citopático	Detecção de RNA de Reovírus	Número de pass. Em RK-13	Intensid. max. do ECP	Tipo do efeito citopático
E	1	++++	SYN	+	7	-	
G	1	++++	SYN	+	5	-	
H	1	++++	SYN	+	5	-	
I	5	-		NT	5	-	
L	5	-		NT	5	-	
M	5	-		NT	5	-	
N	5	-		NT	5	-	
O	6	+	SYN	NT	5	-	
P	1	+	DEG	NT	3	-	
Q	5	-		NT	3	++	DEG
R	5	-		NT	4	++	DEG
T	1	++++	DEG	NT	1	+	DEG
Y	1	++	DEG	NT	3	-	
AP	4	+	SYN	+	3	-	

*Efeito citopático (ECP) negativo ; ECP com +, ++, +++ ou ++++, corresponde, respectivamente, à 25, 50, 75 ou 100% das células destruídas.
**ECP degeneratigo: DEG; ECP sincicial ou misto: SYN.

Tabela 7: Resultados das inoculações de amostras suspeitas de IBDV em FEG e na linhagem celular RK-13 (amostras que causaram ECP em FEG e que *foram* identificadas por PAGE e VN como IBDV)

Amostra	Cultivo em OE	Número de pass. em FEG	Intensidade max. do ECP	Detecção do RNA do IBDV	Vírus neutralização	Número de pass. em RK-13	Intensidade max. do ECP
AA	3	6	+++	+	+	1	+
AB	1	2	++	+	+	6	++
AC	5	4	++++	+	+	1	++
AD	5	3	++++	+	+	5	+
AE	3	3	++++	+	+	4	++
AF	3	3	++++	+	+	2	++
AG	2	4	++	+	+	6	++
AH	2	5	++++	+	+	2	+
AI	4	5	+	+	+	1	++
AJ	2	5	++++	+	+	3	+++
AK	4	2	++++	+	+	4	++
BA	3	1	+++	+	+	1	++
BF	1	2	+	+	+	2	++

4.3- Suscetibilidade de diferentes linhagens celulares ao IBDV e Reovírus

Com a finalidade de avaliar a suscetibilidade de diferentes cultivos celulares ao reovirus e ao IBDV, foram utilizadas duas amostras, S1133 e GBV-8, respectivamente, que foram passadas três vezes em cada linhagem separadamente. Em seguida as suspensões virais provenientes da terceira passagem foram tituladas em cultura primária de embrião de galinha e analisadas quanto à presença de RNA viral (Tabelas 8 e 9). Pode-se observar que a linhagem RK-13 foi a única que apresentou ECP somente para o IBDV enquanto que a CER e BHK-21 foram sensíveis somente ao reovírus (Tabela 9). Além disso, as células RK-13 e a de FEG apresentaram altos títulos para o IBDV (6,9 e 6,7 $\log_{10}$ $DICC_{50\%}$, respectivamente). O reovírus produziu títulos semelhantes em células BHK-21 e em CER (6,4 e 6,15 $\log_{10}$ $DICC_{50\%}$, respectivamente), porém um pouco menor do que o obtido em FEG (7,5 $\log_{10}$ $DICC_{50\%}$). As células BHK-21 apresentaram baixo rendimento viral para IBDV e nas células IB-RS-2 e Vero baixo rendimento viral para reovírus sem manifestação do ECP e nem detecção de RNA viral.

Tabela 8: Suscetibilidade de linhagens celulares e detecção de RNA do IBDV (amostra GBV-8) e reovirus (amostra S1133).

CULTURA CELULAR	IBDV(GBV–8)		Reovirus S1133	
	ECP	PAGE	ECP	PAGE
FEG	+	+	+	+
IB-RS-2	-	-	-	-
RK-13	+	+	-	-
Vero	-	-	-	-
BHK-21	-	-	+	+
CER	-	-	+	+

Tabela 9 : Título viral médio obtido em FEG das amostras de Reovirus e IBDV propagadas em fibroblasto de embrião de galinha e em diferentes linhagens celulares.

Sistema celular de propagação	Título do vírus[a]	
	IBDV	Reovirus
FEG	6.70	7.50
IB-RS-2	0	2.50
RK_{13}	6.90	0
Vero	0	1.12
BHK – 21	2.00	6.40
CER	0	6.15

a:Titulo viral de amostras provenientes de diferentes linhagens celulares, obtido em células FEG e expressos como log $DICC_{50}$ /50μL

4.4. Titulação Viral

Na Tabela 10 estão relacionados os títulos virais obtidos em células de FEG e na linhagem celular RK-13. Pode-se notar que os títulos encontrados na célula FEG são muito semelhantes, variando de 10^7 e 10^8 $DICC_{50}$/50μL, com exceção das amostras AH que apresentou título de 10^4 $DICC_{50}$/50μL e das amostras B, GBV, AB e BA que apresentaram títulos de aproximadamente 10^6 $DICC_{50}$/50μL . Nas células RK-13 foram obtidos, em todas as amostras, títulos menores do que os encontrados em FEG, variando de 10^3 a 10^5 DICC50/50μL . Aplicando-se o teste t para duas amostras em par para médias a diferença entre FEG e RK-13 é significante ao nível de 95% de confiança.

Tabela 10– Título médio em $DICC_{50}$/50µL de amostras de IBDV

AMOSTRAS	FEG	RK-13
A	7,28	6,50
B	6,32	4,75
C	7,20	6,24
GBV	6,70	6,90
G6	7,32	4,66
B7	7,35	4,27
B2	7,03	NF
AC	7,50	4,50
AF	7,16	5,22
AA	7,28	3,66
AB	6,84	5,50
AD	7,88	5,33
AE	7,85	5,50
AG	7,64	5,75
AH	4,60	4,00
AI	8,30	5,50
AJ	7,56	5,24
AK	7,58	5,50
BA	6,43	4,91
BF	7,00	NF

NF- não feito

4.4 Ensaios de vírus neutralização

Na Tabela 11 estão representados os resultados dos títulos médios de anticorpos obtidos no teste de VN realizados em células FEG com soros homólogos e heterólogos utilizando as 12 amostras de campo identificadas como IBDV além das amostras vacinais. Pode-se observar que todas as amostras são do sorotipo 1.

A análise estatística utilizando-se o cálculo do desvio padrão e intervalo de confiança ao nível de 0,05 de significância, 5 amostras apresentam diferenças antigênicas maiores (AD, AF, AH, AI e AJ) para pelo menos 4 dos soros empregados. O soro obtido a partir da amostra G6 apresentou média e intervalo de confiança que inclui os títulos obtidos com todas as amostras vacinais e de campo analisadas.

Foram encontradas diferenças antigênicas em 10, 5, 7, 4 e 7 amostras virais frente aos soros A, B, C, B7 e GBV, respectivamente, conforme representados pelas letras sobrescritas correspondentes (Tabela 11). Estas diferenças foram obtidas através de análise estatística pela verificação dos valores dos títulos heterólogos se eles estariam dentro dos intervalos de confiança dos soros homólogos a 95% de confiança.

Tabela 11: Média geométrica dos títulos médios obtidos no teste de VN realizados em FEG

soros / am.	A	B	C	G6	B7	GBV
A	**1100**	263	53248	1621	256	3100
B	791	**256**	27080[c]	2346	426	2496
C	315	297	**49152**	3925	192	1937
G6	335	372	66355	**2706**	213	1225
B7	683	564	66000	2048	**245**	2204
GBV	668	184	49152	1800	320	**3313**
AA	202[a]	245	36181	1024	128	1792
AC	152[a]	256	43940	2730	155	952[g]
AD	164[a]	162[b]	15213[c]	NF	NF	731[g]
AE	240[a]	224	16384[c]	2048	128	640[g]
AF	248[a]	70[b]	38353	1621	96[b7]	650[g]
AG	96[a]	155[b]	20480[c]	2048	128	2340
AH	307[a]	272	23347[c]	1024	64[b7]	1024[g]
AI	148[a]	72[b]	10240[c]	1024	32[b7]	576[g]
AJ	96[a]	60[b]	16588[c]	4096	128	328[g]
AK	288[a]	272	36864	1024	64[b7]	1152
BA	683	213	13653[c]	1024	128	1536
BF	1024	256	32768	1535	256	1536

Os valores em negrito referem-se aos títulos homólogos; NF= não feito; as letras **a**, **b**, **c**, **b7** e **g** referem-se aos valores significativos dos títulos heterólogos

Na Tabela 12 estão representados a comparação dos valores dos títulos médios obtidos na VN em células RK-13 e FEG utilizando as seis amostras vacinais e mais duas amostras de campo, a partir das quais, foram também preparados soros hiperimunes em coelhos para a realização dos ensaios (AC e AF). Pela análise estatística feita a partir dos dados obtidos na Tabela 12, pode-se verificar que não existe diferença significante entre as células RK-13 e FEG a 95% de confiança (P uni-caudal=0,11) e que nos dois sistemas existe uma correlação linear de 0,99.

Na Tabela 13 estão representados os valores médios da relação antigênica obtidos a partir de cada título no experimento de VN realizado em células FEG. Considerando valores abaixo ou igual à 0,39 como apresentando pouca relação antigênica entre si, pode-se observar que as amostras G6, AC e AF são diferentes de A; AF é muito diferente de B; AC e AF são diferentes de GBV. Todas as amostras apresentam relação antigênica com as amostras C e G6. Estes dados estão de acordo com os encontrados na Tabela 11. A Tabela 14 apresenta a relação antigênica das amostras de IBDV utilizando as células RK-13 para a execução dos experimentos de VN. Pode-se observar que AC é diferente de A; AF e GBV são diferentes de B; AC e AF são diferentes de GBV e todos são semelhantes a C e G6.

Tabela 12: Comparação da média dos títulos obtidos no teste de vírus-neutralização realizados em células RK-13 e FEG

	FEG	RK-13
A	1100	704
B	256	160
C	49152	46421
G6	2706	416
B7	245	180
GBV	3313	768
AC	2048	3072
AF	1843	3072

Tabela 13: Relação antigênica entre as amostras virais obtidas em células FEG

v \ s	A	B	C	G6	B7	GBV	AC	AF
A	**1**							
B	0,76	**1**						
C	0,70	0,81	**1**					
G6	0,36	0,99	1,13	**1**				
B7	1,02	0,96	0,84	0,87	**1**			
GBV	0,66	0,72	0,64	0,55	0,66	**1**		
AC	0,28	0,53	0,80	0,74	0,40	0,33	**1**	
AF	0,19	0,03	0,84	0,90	0,36	0,32	0,72	**1**

Tabela 14: Relação antigênica entre as amostras virais obtidas em células RK-13

v \ s	A	B	C	G6	B7	GBV	AC	AF
A	1							
B	0,61	1						
C	0,42	0,52	1					
G6	0,50	0,87	1,04	1				
B7	0,85	0,92	0,60	0,72	1			
GBV	0,46	0,37	0,40	0,64	0,87	1		
AC	0,26	0,50	0,60	0,70	0,47	0,35	1	
AF	0,47	0,37	0,42	0,60	0,42	0,25	0,75	1

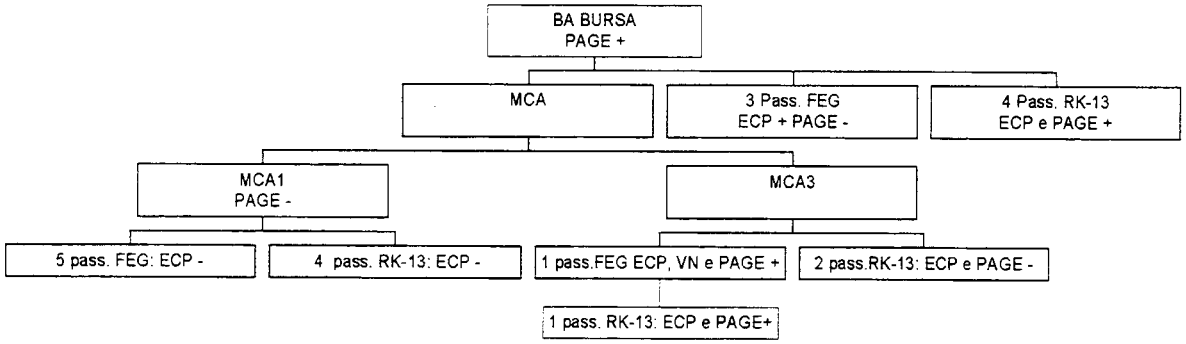
4.5. Propagação das amostras BA e BF em RK-13

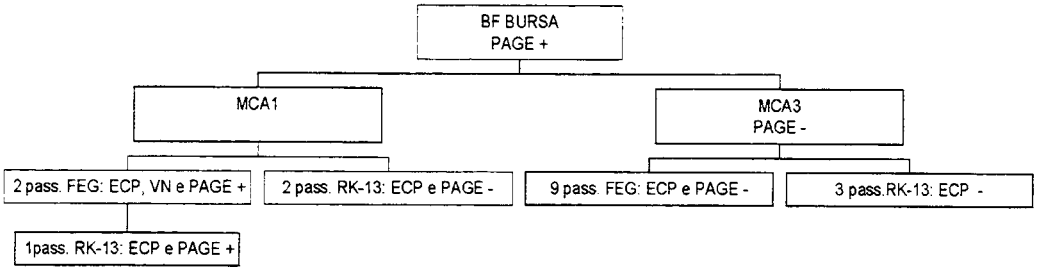
Com o intuito de se verificar se suspensões virais obtidas da bursa poderiam ser propagadas diretamente na linhagem celular RK-13 para facilitar o árduo trabalho de adaptação das amostras, foram feitos diferentes procedimentos utilizando-se diferentes sistemas *in vitro* para a propagação destas duas amostras como observado no fluxograma 1. Pode-se verificar que a amostra BA foi propagada diretamente em células da linhagem RK-13 após 4 passagens onde se observou ECP em 25% das células e também foi confirmada por PAGE como IBDV. Quando a amostra BA MCA3 foi propagada diretamente na cultura RK-13, não foi observado nenhum efeito até a 2° passagem, sendo que a partir daí não foram realizadas mais passagens. A amostra BA MCA1 (isto é amostra BA

proveniente da primeira passagem em MCA) não apresentou ECP quando inoculada nas culturas celulares FEG e RK-13 e nem foi detectado RNA viral no PAGE.

Quando se utilizou uma outra amostra, a BF, ocorreu o inverso, isto é, quando passada 3 vezes em MCA e propagada em FEG até a 9ª passagem não se observou ECP nem se detectou RNA no PAGE, porém quando a MCA1 foi passada em FEG, observou-se que o ECP ocorreu na 2° passagem e em seguida na primeira passagem em RK-13 (PAGE e VN+).

Fluxograma 1: Passagem das amostras BA e BF a partir de macerados de bursas *in vivo* e *in vitro*





4.6. Inoculação experimental de amostras de Reovírus e IBDV em RK-13 e em CER

Na Tabela 15 estão esquematizadas as passagens de uma mistura intencional das suspensões virais do reovírus S1133 com a amostra GBV-8, e a Figura 5 revela os resultados da PAGE das amostras de reovírus, IBDV e da mistura dos dois vírus e denominada de amostra RG. Esta mistura apresentou ECP característico de IBDV, isto é efeito degenerativo, quando propagada em células RK-13 na primeira e na segunda passagem realizada e não foi detectado nenhum tipo de RNA de vírus segmentado. Os controles contento células RK-13 infectadas somente com GBV exibiram ECP tipo DEG e nas suspensões também foi detectado o ácido nucléico do IBDV, porém nos controles de células infectadas somente com reovírus não se verificou ECP nem RNA viral.

Na Tabela 16 estão representados os resultados da infecção em células CER com a mistura RG proveniente da 2ª passagem em RK-13, podemos observar que após 48 horas após a inoculação nas células CER, estas exibiram intensa vacuolização levando à morte celular em poucas horas. Na segunda passagem este efeito, bem como ECP, não foi verificado com as células exibindo morfologia igual às células não inoculadas. O mesmo foi verificado nas células CER inoculadas com amostras de reovírus e de GBV (2ª passagem em células RK-13). Em nenhum dos preparados detectou-se RNA viral.

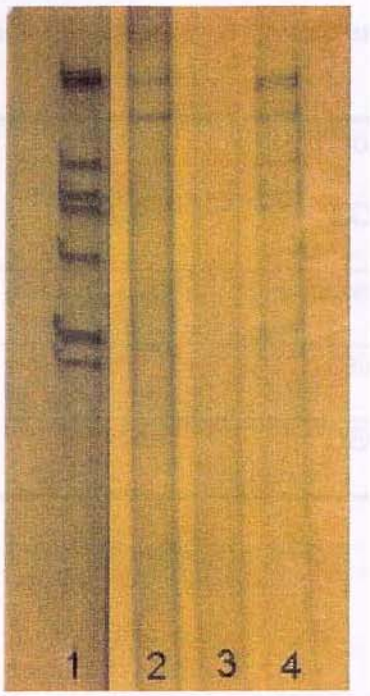


Figura 5: PAGE das amostras de reovírus, GBV e mistura RG. Linha 1: Reovírus S1133; linha 2: IBDV amostra GBV; linha 3: células RK-13 não inoculadas; linha 4: mistura RG.

Tabela 15: Propagação da mistura de reovírus e IBDV em células RK-13.

AMOSTRA	ECP	Tipo do ECP	PAGE	
			IBDV	REO
REOVÍRUS	-	ausente	-	-
IBDV	+++	DEG	+	-
RG	++++	DEG	-	-

Tabela 16: Passagem da amostra-mistura RG nas células CER.

AMOSTRA Proveniente da 2ª passagem em RK-13	ECP	Tipo do ECP	PAGE
REOVÍRUS	-	ausente	-
IBDV	-	ausente	-
RG	-	ausente	-

5. DISCUSSÃO

A avicultura é uma atividade que vem se desenvolvendo e se intensificando nos últimos 25 anos, posicionando o Brasil no cenário internacional como o segundo maior produtor de carne de frango e um dos dez maiores produtores de ovos comerciais. No mercado interno, houve um aumento concomitante da produção brasileira de carne de frango, de ovos comerciais e do consumo destes produtos de origem aviária e uma maior acessibilidade ao segmento da população de baixa renda. O Estado de São Paulo em setores da exploração avícola como produção de ovos, aves comerciais e poedeiras, participa com 40% da produção e em outros setores como matrizes brancas alcança 70%.

A criação intensiva de aves significa que grandes populações vivem em espaços confinados. Nestas condições, a entrada de um patógeno virulento pode causar alta mortalidade e grandes perdas econômicas.

A possibilidade de isolar e cultivar os patógenos *in vitro* representa um dos maiores triunfos para a sanidade animal. Até o momento, o cultivo de patógenos a partir de amostras de campo permanece como pedra fundamental do laboratório clínico.

5.1-Identificação das amostras pela detecção do ácido nucléico viral

Autores têm relatado que a propagação do IBDV, fora do hospedeiro natural, é difícil e trabalhosa e por isso, é importante utilizar um método de alta especificidade com o intuito de identificar o agente infeccioso a partir de materiais de campo (Lukert & Saif, 1997). Para isso, durante o isolamento do vírus, pode-se utilizar a técnica de detecção do ácido nucléico viral pela PAGE. Esta técnica é altamente específica e com boa sensibilidade, embora apresente sensibilidade mais baixa do

que o RT-PCR (Winiarczyk & Gradzki, 1999). Apesar disso a PAGE ainda hoje é amplamente empregada para análise de fezes e outros tecidos infectados por rotavírus ou reovírus em diversas espécies animais (Legrottaglie *et al.*, 1997; Gabbay *et al.*, 1999; Lamirande *et al.*, 1999; Ramos *et al.*, 2000).

A metodologia empregada para detecção de reovírus aviário, foi inicialmente utilizada para a detecção do ácido nucléico do IBDV, entretanto verificamos por várias vezes que a reprodutibilidade na detecção RNA de controles como as amostras vacinais provenientes de culturas celulares infectadas, não estava ocorrendo pois a extração não estava sendo sempre eficiente. Verificamos que a metodologia empregada para identificar vírus segmentados das fezes, o reovírus, tinha que ser modificada principalmente na extração do RNA. Outros fatores também foram considerados como por exemplo, rastro de fenol, perda de material, erros no processo de corrida eletroforética,. Modificações na técnica de extração como por exemplo substituição da solução de fenol-clorofórmio pelo TRIzol®, adição de proteinase K na solução de SDS aos materiais, antes da extração com fenol e aumento no tempo e temperatura de incubação das amostras durante a liberação do ácido nucléico viral do capsídeo, aumentaram a eficiência de extração. Estes procedimentos minimizaram e melhoraram a detecção do RNA do birnavírus.

Várias amostras de IBDV puderam ser detectadas diretamente do tecido infectado (figuras 1 e 2). Por outro lado, muitas vezes a detecção foi difícil em material oriundo de preparações de cultura primária ou de linhagem contínua. Dificuldades semelhantes também foram verificadas por Becht (1981). O autor relata que amostras provenientes de tecido como a bursa de Fabricius o RNA viral é mais facilmente detectável do que em materiais provenientes de culturas celulares. Este fato parece

estar relacionado com a integridade da partícula viral que é maior em cultura celular do que em tecido, neste o vírus perde em estabilidade.

A técnica de PAGE utilizada neste trabalho revelou-se extremamente útil como ferramenta para detecção do IBDV em material suspeito e serviu para acompanhar a presença do vírus durante a propagação nos diversos hospedeiros tanto *in vivo* como *in vitro*.

5.2- Propagação *in vivo*

Quando amostras infectadas foram propagadas *in vitro* verificou-se diferença entre aquelas provenientes da bursa e as provenientes de passagens em MCA. Assim as amostras provenientes de bursa apresentaram mais mortalidade nos ovos embrionados do que as já adaptadas em MCA. Este fato pode estar correlacionado com atenuação onde as amostras propagadas em MCA apresentaram baixa mortalidade. Autores relatam atenuação do vírus em MCA ou em saco vitelino relatando inclusive que o vírus pode sofrer modificação no que se refere a sua patogenicidade ou virulência quando propagadas nestes sistemas (Yamaguchi *et al.*, 1996).

Comportamento semelhante em relação à mortalidade em ovos embrionados, também ocorreu com as amostras de reovírus, a amostra AP proveniente de bursa foi mais agressiva com mais mortalidade e lesões mais freqüentes do que as amostras passadas várias vezes em MCA cujo número de passagens é maior do que 3.

A mortalidade nos ovos embrionados observada nas amostras de reovírus ocorreu no período de 6 a 8 dias ao passo que isto não foi exclusivo nas amostras de IBDV. Pois neste caso foi verificada mortalidade durante todo o período de incubação, porém as amostras suspeitas de IBDV a mortalidade foi mais freqüente no período de 3 a 5 dias pi conforme relatado na literatura (Lukert & Saif, 1997).

Segundo alguns autores o reovírus aviário se multiplica bem tanto em MCA como em saco vitelino. No saco vitelino a mortalidade ocorre geralmente após 3 a 5 dias pós-inoculação, porém em ovos inoculados pela via MCA a mortalidade ocorre depois de 6 dias pi e as lesões mais freqüentes são hepatomegalia e esplenomegalia (Rosenberger & Olson, 1997).

Quando se analisam as lesões encontradas nos ovos embrionados inoculados com as amostras suspeitas, foi difícil associar o tipo de lesão com o vírus presente. Lesões no fígado ocorreram tanto em amostras de reovírus como IBDV sendo algumas delas semelhantes para ambos os vírus (como por exemplo fígado mosqueado) não sendo possível identificar uma característica particular para o IBDV. Por outro lado, as lesões mais freqüentes para o reovírus como hepatomegalia e esplenomegalia, também foram relatadas por outros autores (Robertson, 1986; Rosenberger & Olson, 1997). As lesões renais e alterações no coração também ocorreram tanto em amostras de reovírus como no IBDV embora palidez no coração foi mais freqüente no IBDV (47% das amostras) do que em reovírus (25%).

5.3- Propagação *in vitro*

A maior parte das linhagens celulares utilizadas neste trabalho foi escolhida pela facilidade com que poderiam ser obtidas e mantidas em laboratórios de rotina. As mais comuns são as células, BHK-21, RK-13, IB-RS-2 e Vero. Além disso, utilizou-se neste trabalho uma linhagem menos conhecida mas cuja origem, de embrião de galinha, nos entusiasmou a usar, por ser uma cultura celular permanente. Esta linhagem poderia ser mais promissora para propagar um vírus de ave uma vez que é difícil entender como pode ocorrer propagação de um vírus cuja versão similar não foi relatada em mamíferos (Becht, 1981; Kibenge & McKenna, 1992). Entretanto os resultados obtidos (Tabela 3) não foram os esperados pois esta linhagem se mostrou pouco suscetível com apenas uma amostra viral capaz de causar efeito citopático nas células CER. Provavelmente nesta linhagem, é necessário realizar

mais do que cinco passagens para o aparecimento do ECP, como verificado anteriormente por Arns *et al.*, 1994. Embora Cardoso *et al.* (2000), tenham conseguido propagar o IBDV nas células CER com observação de ECP logo nas primeiras passagens, a amostra que os autores utilizaram estava adaptada em ovos embrionados diferente das amostras vacinais utilizadas neste trabalho, que foram propagadas apenas em culturas primárias de embrião de galinha.

A linhagem celular RK-13 por sua vez, mostrou-se suscetível a quase todas as amostras vacinais empregadas (tabela 3). Apenas duas amostras a G2 e BP não foi observado ECP em RK-13, apesar do ECP ter sido observado em FEG. A origem das estirpes virais vacinais pode em parte explicar estas diferenças encontradas no comportamento entre as células FEG e RK-13. Entretanto é muito difícil obter informações suficientes sobre as características dos vírus empregados na produção das vacinas. Kouwenhoven (1995), comenta que as vacinas D-78 e Bursine-2 (que receberam neste trabalho a designação de amostra A e B2, respectivamente) são conhecidas como intermediárias e as vacinas 228E e Bursine Plus (que receberam neste trabalho a designação de amostra G2 e BP, respectivamente) como estirpes de vírus mais virulentos e com patogenicidade residual.

É interessante notar também que todas as linhagens celulares de mamíferos utilizadas neste trabalho tenham se mostrado sensível ao IBDV uma vez que vírus da família *Birnaviridae* não é encontrado em animais superiores (Kibenge *et al.*, 1988).

A suscetibilidade de linhagens celulares a um determinado vírus pode não corresponder ao que ocorre *in vivo* (Fernandes & Simoni, 1995). Assim, vírus que são específicos para uma espécie animal, podem se replicar em linhagens celulares de outras espécies (Munford & Simoni, 1996).

Neste trabalho verificou-se que todas as linhagens oriundas de mamíferos apresentaram suscetibilidade para pelo menos uma das amostras de IBDV empregadas. Todas as células permitiram a replicação viral com produção de ECP.

A células Vero e RK-13 foram as que se mostraram mais sensíveis ao IBDV, fato este também verificado por outros autores (Jackwood *et al.*, 1987; Petek *et al.*, 1973).

Na linhagem RK-13 todas as amostras de campo que causaram ECP em FEG também provocaram ECP em RK-13 (tabela 4, 6 e 7). Por outro lado, as outras linhagens contínuas não exibiram ECP em pelo menos uma das amostras vacinais estudadas (tabela 4 e 7). Além disso, o ECP em RK-13, foi mais pronunciado do que nas células Vero e SK-6 e foi semelhante ao verificado na FEG e nas células IB-RS-2. Esta última apresentou ECP logo nas primeiras passagens em duas das amostras testadas e o tempo de aparecimento do ECP foi mais rápido do que na FEG, entretanto, as amostras A e B não produziram ECP nestas células, até a quinta passagem.

Nas células Vero todas as amostras de IBDV utilizadas na tabela 4, produziram ECP entretanto o tempo para o aparecimento do mesmo (HPI) foi maior do que na RK-13. Nas células SK-6 o HPI também foi maior, além disso, as amostras C e D não apresentaram ECP até a 5ª passagem.

A análise estatística utilizando o teste t de student mostra que há diferença significativa entre as células RK-13 e Vero quando comparamos a intensidade máxima (IM) do aparecimento do ECP a 95% de confiança, para comparação unilateral e que o número de passagens (NP) para ocorrer o aparecimento do ECP ou as horas (HPI) necessárias para o aparecimento do ECP não apresentaram diferenças significativas entre as células RK-13 e Vero. Além disso não existe diferença significativa entre as células RK-13 e FEG em todos os parâmetros, intensidade máxima (IM), número de passagens (NP) e horas pós-inoculação (HPI).

As linhagens Vero e RK-13, portanto, mostraram efeito citopático semelhante ao observado nas células FEG porém, quando se comparou com as linhagens Vero e RK-13, esta última mostrou efeito citopático mais proeminente do que o observado com a Vero. Isto é importante em experimentos de vírus neutralização onde o título do soro neutralizante é obtido através da visualização do efeito citopático, se este é bem evidente os resultados serão mais confiáveis.

As linhagens celulares de origem suína apresentaram suscetibilidade em somente 50% das amostras testadas (Tabela 4). Além disso, as células SK-6 necessitaram de muitas passagens para o aparecimento de efeito citopático do que para a linhagem IB-RS-2 que foi necessário apenas uma ou duas passagens para a observação do efeito citopático e muito menos do que o número necessário de passagens observadas também com a Vero e RK-13. Não se tem descrito na literatura relatos de propagação do IBDV em células de origem suína.

Embora se sabe que técnicas moleculares como PCR e sequênciamento são atualmente empregadas para a caracterização de um vírus, não se pode deixar de lado as técnicas tradicionais empregadas em trabalhos em virologia, principalmente as que utilizam culturas celulares, pois neste caso se trabalha com o vírus infeccioso além de que muitas informações podem ser obtidas quando utilizamos as culturas celulares. Fato este verificado quando trabalhamos com as duas linhagens celulares RK-13 e CER. Uma linhagem foi muito suscetível ao IBDV enquanto outra foi muito suscetível ao reovírus.

5.4- Suscetibilidade de diferentes linhagens celulares ao IBDV e reovírus

Várias linhagens celulares foram comparadas quanto à suscetibilidade a duas amostras, uma de reovírus (amostra S1133) e outra de IBDV (amostra GBV), com objetivo de estudar melhor qual

cultura celular poderia ser escolhida para estabelecer um sistema vírus célula ideal para a propagação do IBDV. Para isto avaliou-se a observação de ECP correlacionando com a obtenção de títulos virais e detecção de RNA viral.

Assim o IBDV se replicou em células RK-13 e causou ECP evidente e semelhante ao observado nas culturas primárias de embrião de galinha. Por outro lado as células BHK-21 não apresentaram ECP visível, porém ocorreu alguma replicação viral nestas células com pequena produção de título viral que não foi suficiente para ser detectado no PAGE. Estes resultados aparentemente são diferentes dos observados por Petek *et al.* (1973) com linhagem BHK-21 pois esta, não foi suscetível ao IBDV. Os autores utilizaram apenas a observação de efeito citopático sem utilizar suspensões virais provenientes de passagens nas células BHK-21 para serem inoculadas em sistemas mais sensíveis com o objetivo de detectar alguma replicação viral como o realizado neste trabalho.

As células Vero, CER e IB-RS-2 não mostraram ECP nem título viral para a amostra GBV-8. Alguns autores relatam a utilização das células Vero para a propagação do IBDV e em experimentos de vírus neutralização (Jackwwod *et al.*, 1987; Giambrone , 1980). No entanto neste trabalho quando utilizamos a amostra GBV-8 nas três primeiras passagens esta amostra viral não foi eficiente provavelmente seria necessária muito mais passagens para adaptar esta amostra vacinal nas células Vero. Isto não foi necessário nas células RK-13 por ser uma linhagem mais sensível ao IBDV.

A linhagem RK-13 foi a única que não se mostrou suscetível ao reovírus, fato este também relatado por Petek *et al.* (1973). Este achado é bastante útil quando do isolamento do vírus a partir de tecidos de bursa que possam estar infectados tanto com IBDV como com reovírus. Outros autores relatam a utilização de culturas primárias para separar estes dois vírus (Gelenczei & Lunger, 1970), porém não há relatos utilizando linhagens celulares com este intuito.

5.5- Titulação viral

A análise estatística mostra que existe diferença entre os títulos das amostras virais propagadas em culturas primárias e as células RK-13. Isto significa que o rendimento viral na linhagem contínua RK-13 é menor do que o obtido em FEG. Este resultado limita a utilização da linhagem contínua RK-13 principalmente para produção maciça de antígeno. Embora durante a realização deste trabalho inicialmente utilizamos uma linhagem RK-13 de outra origem, cedida pelo Instituto Desidério Finamor, esta foi posteriormente substituída pela mesma linhagem, porém, proveniente da ATCC e que passou a ser empregada durante toda a realização dos experimentos. As células do Instituto Desidério Finamor apresentaram rendimento viral igual ao obtido com as células FEG (dados não mostrados) ao passo que as obtidas da ATCC foram menos suscetíveis. Diferenças na suscetibilidade de uma mesma linhagem celular mantida em laboratórios diferentes têm sido relatadas por muitos autores, (Simoni & Fernandes, 1995; Kubrusly & Koseki, 1981; Takata *et al.*, 1994). Assim, Simoni & Fernandes (1995) relataram diferenças na suscetibilidade ao vírus da doença de Aujeszky em células Vero provenientes do Instituto Adolfo Lutz com a fornecida pela ATCC; Kubrusly & Koseki (1981) em células BHK-21 inoculadas com o vírus da febre aftosa e Takata *et al.* (1994) em células Vero inoculadas com o vírus do sarampo. Portanto, comportamento diferente das linhagens celulares a uma determinada infecção viral pode ser decorrente de alterações genéticas e/ou ambientais as quais as culturas celulares estão expostas (Clake & Spier, 1980; Kubrusly & Koseki, 1981).

5.6- Ensaios de vírus-neutralização

Os resultados obtidos nos experimentos de vírus neutralização simples, indicam que as amostras de campo apresentam variabilidade antigênica, sendo que os soros vacinais protegem em vários graus

contra os vírus de campo. Além disso, foram encontradas diferenças antigênicas significativas com as amostras suspeitas principalmente com o soro produzido a partir da amostra vacinal A. Esta é uma das vacinas amplamente utilizada nos planteis para a imunização tanto de frangos de corte como aves de postura (Kouwenhoven, 1995), inclusive no esquema de vacinação empregado nas granjas onde foram isoladas as amostras BA e BF. Neste caso, a utilização das amostras vacinais A e B7 para a imunização revelam a existência de uma forte correlação entre as amostras de campo, principalmente com a amostra BF, e as vacinas.

A variabilidade antigênica inerente para este vírus tem sido relatada por outros autores (Jackwood & Saif, 1987; McNulty & Saif, 1988; Fahey, *et al.*, 1991;;Ismail & Saif, 1991; Schnitzler, *et al.*, 1993) variando em até 30% de proteção. Estes dados sugerem que no Brasil, não foi até o momento, encontrada amostra variante semelhantes àquelas encontradas nos Estados Unidos (Jackwood & Saif, 1987) e nem identificada amostras do sorotipo 2. Por outro lado, as amostras (BO, BH, BN e BJ) que foram obtidas recentemente neste trabalho e provenientes de frangos de corte, não foram propagadas eficientemente *in vitro* tanto nas culturas primárias como nas células RK-13. Provavelmente pode ter ocorrido uma mudança nos vírus presentes nas granjas levando ao aparecimento de amostras difíceis de adaptação em linhagens celulares. Estas amostras provavelmente, podem ser semelhantes àquelas descritas como altamente virulentas como as relatadas por Di Fabio *et al.* (1999). Atualmente recomenda-se a utilização de amostras vacinais mais agressivas ou mais virulentas, tais como as utilizadas no preparo da vacina 228E, para o controle das amostras altamente virulentas (Preez, 1995), entretanto é necessário aprofundar os conhecimentos sobre a real situação do plantel nacional antes da introdução de vacinas vivas que podem apresentar patogenicidade residual.

Além disso, vários autores relatam que as amostras altamente virulentas não apresentam diferenças antigênicas suficientes para que vacinas clássicas não sejam efetivas e que possam ser detectadas no teste de vírus-neutralização, isto é, as vacinas comerciais disponíveis conferem proteção contra as amostras altamente virulentas (Van Den Berg *et al.*, 1991; Tsukamoto *et al.*, 1995; Pitcoviski *et al.*, 1998).

Quando se compara a cultura celular FEG e a linhagem RK-13 durante os testes de vírus-neutralização observa-se que a linhagem celular RK-13 não apresenta diferenças significativas nos títulos dos soros homólogos obtidos com os das estirpes vacinais, sendo que existe uma correlação linear de 0,99. Este coeficiente de correlação alto indica forte relação linear entre os títulos obtidos usando FEG e aqueles obtidos usando RK-13. Neste caso, as células RK-13 podem ser substituídas pelas células FEG.

Poucos são os relatos referentes ao estudo comparativo entre resultados de vírus-neutralização envolvendo culturas primárias e linhagens permanentes. Jackwood *et al.* (1987) quando estudaram a linhagem BGM-70 comparou resultados de vírus-neutralização entre esta linhagem e a de embrião de galinha, onde cita não ter encontrado diferenças entre os dois sistemas celulares, apesar de não ter apresentado os valores dos títulos.

5.7- Propagação do IBDV de bursa em células RK-13

Segundo os resultados observados no fluxograma 1 de passagens dos macerados de bursa nos dois sistemas (cultura primária e RK-13), verifica-se que as células RK-13 se comportaram de modo semelhante quando a amostra foi proveniente da BF. O mesmo não foi observado quando o mesmo vírus foi propagado *in vitro*, isto é, foi necessário pelo menos uma passagem em cultura primária de

embrião de galinha para que a amostra viral (ver no fluxograma amostra BA bursa MCA3) pudesse ser propagada em linhagem contínua. Além disso na amostra BA bursa, quando o vírus foi propagado na MCA, foram necessárias três passagens para que o mesmo pudesse ser recuperado. Por outro lado a amostra BF bursa foi recuperada logo na primeira passagem sendo perdida na terceira passagem. Provavelmente este fato seja decorrente de erros durante a inoculação. Não foram encontrados na literatura relatos descrevendo estes eventos e são poucos os trabalhos que utilizam amostras de IBDV isoladas diretamente dos tecidos infectados em linhagens contínuas com visualização de efeito citopático (Hassan *et al.*, 1996). Já Cardoso *et al.* (2000) conseguiram propagar uma amostra vacinal adaptada em ovos embrionados diretamente em células CER, entretanto os autores não trabalharam com amostras de campo.

Vários autores relatam que algumas amostras de IBDV não propagam em cultivo *in vitro* como por exemplo em células FEG (Mc Ferran *et al.*, 1980), outras amostras antes de serem propagadas em cultivo celular têm de ser inoculadas várias vezes em galinhas. Este procedimento provavelmente é feito com o intuito de melhorar o título viral.

5.8- Inoculação experimental de uma mistura de reovírus e IBDV em células RK-13 e em CER

Muitas vezes durante o isolamento de uma amostra viral nos tecidos suspeitos, estes podem conter vírus infecciosos diferentes, principalmente aqueles em que o órgão-alvo é comum (Robertson & Wilcox, 1986; Rosemberg & Olson, 1997). Existem relatos de que o reovírus, muitas vezes presente em aves clinicamente sadias, pode agir em sinergismo, como por exemplo, com o vírus da doença de Marek, o que pode levar à imunossupressão das aves confundindo o agente etiológico (Robertson &

Wilcox, 1986; Rosemberg & Olson, 1997). Por este motivo é de grande valia se ter em mãos um sistema celular que possa ser utilizado para separar vírus indesejáveis como é o caso do reovírus quando se quer isolar IBDV. Uma vez que se usa normalmente para o isolamento de vírus sem envoltório o clorofórmio que elimina vírus com envoltório lipídico, a preocupação se volta para os vírus sem envoltório como no caso do reovírus. Além disso, este vírus se propaga muito bem em MCA (Rosenberger & Olson, 1997; Lukert & Saif, 1997) porém não se sabe o que acontece quando os dois estão presentes durante a propagação *in vitro*.

Neste trabalho, foi feito um estudo adicional misturando os dois vírus (ver figura 5) e em seguida essas mistura foi inoculada em células RK-13 que se mostrou não permissiva tanto para amostras isoladas do reovírus como numa coinfecção. Assim, tanto o IBDV sozinho como na mistura de IBDV e reovírus (RG) inoculados nas células RK-13 apresentaram ECP tipo DEG característico de IBDV (tabela 15), indicando que a replicação ocorreu de pelo menos um dos vírus ou do IBDV ou do reovírus. É de se supor que o ECP observado na mistura RG seja devido ao IBDV. Por outro lado, se a inoculação dos dois vírus na célula RK-13 de alguma forma levasse a replicação do reovírus sem o aparecimento de ECP quando esta amostra fosse propagada em uma cultura celular suscetível, como por exemplo a linhagem CER, o reovírus poderia ser detectado ou por ECP ou pela detecção do RNA viral. Entretanto em nenhuma das amostras, proveniente de passagens em RK-13 e inoculadas em CER, exibiram ECP e nem foram detectadas pela PAGE (tabela 16), indicando a ausência de replicação viral inclusive da presença de reovírus. Foram encontrados poucos trabalhos que relatam interação entre dois vírus infectados numa mesma célula (Alonso *et al.*, 1999). A maioria dos trabalhos são sobre coinfecção e interferência viral estes relatam dupla infecção como em gastroenterites virais com sorotipos diferentes de um mesmo vírus, como por exemplo os reovírus e seus efeitos em rearranjos

dos segmentos genômicos (Keirstead & Kevin, 1998). Autores também descrevem sobre a interferência viral que pode afetar o crescimento do vírus inibindo ou favorecendo sua replicação (Marschall *et al.*, 1998; Alonso *et al.*, 1999). Marschall *et al.*, 1998 estudaram a dominância de fenótipos durante infecção persistente do vírus C da influenza variante e selvagem. Alonso *et al.*, (1999) descreveram que o vírus da necrose pancreática infecciosa interfere na multiplicação do vírus da necrose hematopoiética infecciosa em cultura celular BF-2. O vírus da necrose pancreática infecciosa é um representante da família *Birnaviridae* que infecta os peixes, principalmente os salmonideos. Quando as células BF-2 foram inoculadas com o vírus da necrose hematopoiética infecciosa ocorreu um decréscimo no título infeccioso numa coinfecção, comparado com o obtido com o mesmo vírus numa infecção simples. Provavelmente a coinfecção do IBDV com o reovírus pode ter provocado uma redução da quantidade do IBDV e por isto pode não ter sido detectado pela PAGE (tabela 15) apesar de ter sido observado ECP.

6. CONCLUSÕES

- A técnica da PAGE revelou-se útil para a detecção do IBDV a partir da bursa de Fabrícius e pode ser utilizada para monitorar a presença do vírus nos diferentes hospedeiros;
- Todas as linhagens provenientes de mamíferos foram sensíveis ao IBDV, inclusive as de origem suína;
- Somente a linhagem RK-13 foi não foi suscetível ao reovírus aviário sendo que todas as outras linhagens foram suscetíveis ao reovírus;
- A linhagem RK-13 se comportou semelhante à cultura primária de embrião de galinha quanto à propagação do IBDV;
- A linhagem CER se comportou semelhante à cultura primária de embrião de galinha quanto à propagação do reovírus;
- Todas as amostras de campo isoladas são do sorotipo 1;
- Amostras de IBDV foram isoladas diretamente da bursa de Fabrícius em células RK-13;
- As células RK-13 são refratárias à infecção com amostras de IBDV adaptadas em ovos embrionados;
- O rendimento viral do IBDV observado em células RK-13 foi menor do que em FEG
- As células RK-13 podem substituir as culturas primárias para a realização do teste de vírus neutralização.
- As células RK-13 permitem a replicação apenas do IBDV em suspensões virais mistas (reovírus e IBDV).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Allan, W.H.; Faragher, J.T. and Cullen, G.A. Immunossupression by the infectious bursal agent in chickens immunized against Newcastle disease. **Vet. Rec. 90**: 511-512, 1972.

Alonso, M.; Rodriges, S. and Perez-Prieto, S.I. Viral coinfection in salmonids: infectious pancreatic necrosis virus interferes with infectious hematopoietic necrosis virus. **Arch. Virol 144**: 657-673, 1999.

Arns, C. W.; Castro, T.A.M.G.; Parreira, V.R.; Campalans, J.F.B. Propagation of field strains of infectious bursal disease virus in different cell cultures. **National Meeting of Virology**, São Lourenço, Brazil, resumo p.A19, 1994.

Becht, H. Infectious bursal disease virus. **Curr. Top. Microbiol. Immunol. 90**: 107-121, 1981.

Benton, W.J.; Cover, M.S.; Rosenberger, J.K. and Lake, R.S. Physiochemical properties of the infectious bursal agent (IBA) of chickens. **Avian Dis. 11**: 439-445, 1967.

Brown, M.D.; Green, P. and Skinner, A. VP2 sequences of recent European 'very virulent' isolates of infectious bursal disease virus are closely related to each other but are distinct from those of 'classical' strains. **J. Gen Virol. 75**: 675-680, 1994.

Cao, Y.C.; Yeung, W.S.; Law, M.; Bi, Y.Z.; Leung, F.C. and Lim, B.L. Molecular characterization of seven Chinese isolates of infectious bursal disease virus: classical, very virulent, and variant strains. **Avian Dis. 42**: 340-351, 1998.

Cardoso, T.C.; Rahal, P.; Pilz, D.; Teixeira, M.C.B. and Arns, C.W. Replication of classical bursal disease virus in the chicken embryo related (CER) cell line. **Avian Pathol. 29**: 213-219, 2000.

Chettle, N.; Stuart, J.C. and Wyeth, P.J. Outbreak of virulent infectious bursal disease in East Anglia. **Vet. Rec. 125**: 271-272, 1989.

Cheville, N. F. Studies on the pathogenesis of Gumboro disease in the bursa of Fabricius and thymus of chicken. **Am. J. Pathol. 51**: 527-551, 1967.

Cho, B. Experimental dual infections of chickens with infectious bursal and Marek's disease agents. I. Preliminary observations on the effect of infectious bursal agent on Marek's disease. **Avian Dis. 14**: 655-675, 1970.

Cho, Y. & Edgar, S.A. The infectious bursal agent and pathology of the disease. **Poult. Sci 47**: 1661 (abstract), 1968.

Cho, Y. & Edgar, S.A. Characterization of the infectious bursal agent. **Poult. Sci. 48:** 2102- 2109, 1969.

Clarke, J.B. & Spier, R.E. Variation in the susceptibility of BHK populations and cloned cell lines to three strains of Foot-and-mouth disease virus. **Arch. Virol. 63**: 1-9, 1980.

Cosgrove, A.S. An apparently new disease of chickens avian necrosis. **Avian Dis. 6**: 385-389, 1962.

Cowen, B.S. & Braune, M.O. The propagation of avian viruses in a continuous cell line (QT35) of Japanese quail origin. **Avian Dis., 32**:282-297., 1988.

DiFabio, J.; Rossini, L.I.; Eterradossi, N.; Toquin, M.D. and Gardin, Y. European-like pathogenic infectious bursal disease viruses in Brazil. **Vet. Rec. 14**: 203-204, 1999.

Dobos, P.; Hill, B.J.; Hallett, R.; Kells, D.T.C.; Becht, H. and Teninges, D. Biophysical and biochemical characterization of five animal viruses with bisegmented double-stranded RNA genomes. **J. Virol. 32**: 593-605, 1979.

Dormitorio, T.V.; Giambrone, J.J and Duck, L.W. Sequence comparisons of the variable VP2 region of eight infectious bursal disease virus isolates. **Avian Dis 41**:36-44, 1997.

Dybing, J.K and Jackwood, D.J. Antigenic and immunogenic properties of baculovirus-expressed infectious bursal disease viral proteins. **Avian Dis 42**: 80-91, 1998.

Edgar, S.A. & Cho, Y. The epizootiology of infectious bursal disease and prevention of it by immunization. **Dev. Biol. Stand. 33**: 349-56, 1976.

Fahey, K.J.; McWaters, P.; Brown, M.A.; Erny, K.; Murphy, V.J. and Hewish, D.R. Virus-neutralizing and passively protective monoclonal antibodies to infectious bursal disease virus of chickens. **Avian Dis. 35**: 365-373, 1991.

Fernandes, M.J.P. & Simoni, I.C. Caracterização de Linhagens Celulares I- Identificação de espécies por análise isoenzimática. **Arq. Inst. Biol. 62**: 65-72, 1995.

Kaufer, I. & Weiss, E. Significance of bursa of Fabricius as target organ in infectious bursal disease of chickens. **Infect Immun. 27**: 364-367, 1980.

Kibenge, F.S.B. & Kenna, K.M. Isolation and propagation of Infectious bursal disease virus using the ovine kidney continuous cell line. **Avian Dis. 36**: 256-261, 1992.

Gabbay, Y.B.; Jiang, B.; Oliveira, C.S.; Mascarenhas, J.D.; Leite, J.P.; Glass, R.I. and Linhares, A.C. An outbreak of group C rotavirus gastroenteritis among children attending a day-care center in Belén, Brazil. **J. Diarrhoeal Dis. Res. 17**: 69-74, 1999.

Gelenczei, E.F. & Lunger, P.D. Isolation of a reovirus from bursa of Fabricius of chickens affected by infectious bursal disease. **J.A.V.M.A. 156**: 1270-1271, 1970.

Giambrone, J.J.; Eidson, C.S.; Page, R.K.; Fletcher, O. J.; Barger, B.O. and Kleven, S.H. Effect of infectious bursal agent on the response of chickens to Newcastle disease and Marek's disease vaccination. **Avian Dis. 20**: 534-544, 1976.

Giambrone, J.,J Microculture neutralization test for serodiagnosis of three Avian Viral infections. **Avian Dis. 24**: 284-287, 1980.

Harkness, J.W.; Alexander, D.J.; Pattison, M. and Scott, A.C. Infectious bursal agent: Morphology by negative stain electron microscopy. **Arch Virol. 48**: 63-73, 1975.

Hassan, M.K.; Saif, Y.M. and Shawky, S. Comparison between antigen-capture ELISA and conventional methods used for titration of infectious bursal disease virus. **Avian Dis. 40**: 562-566, 1996.

Hassan, M.K. & Saif, Y.M. Influence of the host system on the pathogenicity, immunogenicity, and antigenicity of infectious bursal disease virus. **Avian Dis. 40**: 553-561, 1996.

Herring, A.J., Inglis, N.F.; Ojeh, C.K.; Snodgrass, D.R. and Menzies, J.D. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. **J.Clin. Microbiol. 16**: 473-477,1982.

Hirai, K. & Calnek, B.W. In vitro replication of infectious bursal disease virus in established lymphoid cell lines and chickens B lymphocytes. **Infect. Immunol. 25**: 964-970, 1979.

Hitchner, S.B. Infectivity of infectious bursal disease virus for embryonated eggs. **Poult. Sci. 49**: 511-516, 1970.

Ismail, N.,M.; Saif, Y.M. and Moorhead, P.D. Lack of pathogenicity of five serotypes 2 IBDV in chickens. **Avian Dis. 32**: 757-759, 1988.

Ismail, N.M & Saif, Y.M Immunogenicity of infectious bursal disease virus in chickens. **Avian Dis 35**: 460-469, 1991.

Jackwood, D.J. & Jackwood, R.J. Infectious bursal disease viruses: Molecular differentiation of antigenic subtypes among serotype 1 viruses. **Avian Dis. 38**: 531-537, 1994.

Jackwood, D.J. & Jackwood, R.J. Molecular identification of strains of infectious bursal disease virus. **Avian Dis 41**: 97-104, 1997.

Jackwood, D.J. & Saif, Y.M. Antigenic diversity of infectious bursal disease virus. **Avian Dis. 31**: 766-770, 1987.

Jackwood D.J.; Saif, Y.M. and Hughes, J.H. Characteristics and serologic studies of two serotypes of IBDV in Turkeys. **Avian Dis. 26**:871-881, 1982.

Jackwood, D.J.; Saif, Y.M. and Hughes, J.H. Replication of IBDV in continuous cell line. **Avian Dis. 31:** 370-375, 1987.

Jackwood, D.J. & Sommer, S.E. Restriction fragment length polymorphisms in the VP2 gene of infectious bursal disease viruses. **Avian Dis. 41**: 627-37, 1997.

Jackwood, D.J. & Sommer, S.E. Restriction fragment length polymorphisms in the VP2 gene of infectious bursal disease viruses from outside the United States. **Avian Dis. 43**: 310-314, 1999.

Juang, R.H.; Chang, Y.D.; Sung, H.Y. and Su, J.C. Oven-drying method for polyacrylamide gel slab packed in cellophane **Anal. Biochem. 141**: 348-50, 1984.

Keirstead, N.D. & Kevin, C.M. Absence of superinfection exclusion during asynchronous reovírus infections of mouse, monkey, and human cell lines. **Virus Res. 54**: 225-235, 1998.

Kibenge, F.S.B.; Dhillon, A.S. and Russel, R.G. Biochemistry and immunology of infectious bursal disease virus. **J. Gen. Virol. 69**: 1757-1775, 1988.

Kibenge, F.S.B.; McKenna, P.K. Isolation and propagation of IBDV using the ovine kidney continuous cell line. **Avian Dis., 36**: 256-261, 1992.

Koster, J.; Becht, H. and Rudolph, R. Properties of the infectious bursal agent of chicken (IBA). **Med. Microbiol. Immunol. 157**: 291-298, 1972.

Kouwenhoven, B. El control de la enfermedad de Gumboro muy virulenta en Holanda. **World Poultry (supl.)**: 15-16, 1995.

Kubrusly, F.S. & Koseki, I. Caracterização de duas culturas celulares da linhagem BHK-21 de procedências diferentes pela morfologia, cariótipo, crescimento populacional e suscetibilidade ao vírus da febre aftosa. **Arq. Inst. Biol. 48**: 49-59, 1981.

Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature 227**: 680-685, 1970.

Lamirande, E.W.; Nichols, D.K.; Owens, J.W.; Gaskin, J.M. and Jacobson, E.R. Isolation and experimental transmission of a reovirus pathogenic in ratsnakes (*Elaphe* species) **Virus Res. 63**: 135-141, 1999.

Legrottaglie, R.; Rizzi, V. and Agrimi, P. Isolation and identification of avian rotavirus from pheasant chicks with signs of clinical enteritis. Comp. Immunol. Microbiol. **Infect. Dis. 20(3)**: 205-10, 1997.

Lombardo, E.; Maraver, A.; Castón, J.R.; Rivera, J.; Fernández-Aria, A.; Serrano, A.; Carrascosa, J.L. and Rodriguez, J.F. VP1, the putative RNA-dependent RNA polymerase of infectious bursal disease virus, forms complexes with the capsid protein VP3, leading to efficient encapsidation into virus-like particles. **J. Virol. 73(8):** 6973-6983, 1999.

Lukert, P.D. & Davis, R.B. Infectious bursal disease virus: growth and characterization in cell cultures. **Avian Dis. 18**: 243-250, 1974.

Lukert, P.D & Saif, Y.M. Infectious bursal disease. In: B.W. Calnak, H.J.; Barnes, C.W.; Beard, W. M. & Yoder, H.W. (Eds.), **Disease of Poultry**, 9 ed. Iowa State University Press, Ames, 10, pp. 721-738, 1997.

Lunger, P.D. and Maddux, T.C. Fine-structure studies of avian infectious bursal agent. I. In vivo viral morphogenesis. **Avian Dis. 16**: 874-893, 1972.

Marschall, M; Helten A.H.; Zach, A. and Meire-Ewrt, H. Persistent infection with an influenza C virus variant is dominantly established in the presence of parental wild-type virus. **Virus Res. 54**: 51-58, 1998.

Mazariegos, L.A.; Lukert, P.D. and Brown, J. Pathogenicity and immunosuppressive properties of infectious bursal disease "intermediate" strains. **Avian Dis. 34**: 203-208, 1990.

McFerram, J.B.; McNulty, M.S.; McKillop, E.R.; Connor, T.J.; McCracken, R.M.; Collins, D.S. and Allan, G.M. Isolation and serological studies with IBDV from fowl, turkeys and ducks: Demonstration of a second serotype. **Avian Pathol. 9**: 395-404, 1980.

McNulty, M.S. & Saif, Y.M. Antigenic relationship of non-serotype 1 turkey infectious bursal disease virus. **Avian Dis. 32**: 374-75, 1988.

Müller, H. Replication of infectious bursal disease virus in lymphoid cell. **Arch. Virol. 87**: 191-203, 1986.

Müller, H. & Becth, H. Biosynthesis of virus-specific proteins in cells infected with infectious bursal disease virus and their significance as structural elements for infectious virus and incomplete particles. **J. Virol. 44**: 384-392.

Mundt, E. Tissue culture infectivity of different strains of infectious bursal disease virus is determined by distinct amino acids in VP2. **J. Gen. Virol. 80**: 2067-2076, 1999.

Munford, V. & Simoni, I.C. Efeito da temperatura de estocagem sobre o poder infectante do vírus da rinotraqueite infecciosa bovina. **Biotemas 9(1):** 7-12, 1996.

Murphy, F.A; Fauquet, C.M.; Bishop, D.H.L.; Ghabrial, S.A.; Jarvis, A.W.; Martelli, G.P.; Mayo, M.A. and Summers, M.D. Vírus Taxonomy **Arch Virol. Suppl. 10**: 240-244, 1995.

Nakano, M.; Portugal, M.A.S.C.; Saliba, A.M.; Nobre, D. and Narimatsu, M.N. A ocorrência de doença de Gumboro no Brasil. Diagnóstico anatomopatológico. **Biológico, 38**: 60-61, 1972.

Nick, H.D.; Cursiefen, D. and Becht, H. Structural and growth characteristics of infectious bursal disease virus. **J. Virol. 18**: 227-234, 1976.

Nunoya, T.; Otaki, Y.; Tajima, M.; Hiraga, M. and Saito, T. Occurrence of acute Infectious Bursal Disease with high mortality in Japan and pathogenicity of field isolates in specific-pathogen-free chickens. **Avian Dis. 36**: 597-609, 1992.

Ojeda, F; Skardova, I.; Guarda, M.I.; Ulloa, J. and Folch, H. Proliferation and apoptosis in infection with infectious bursal disease virus: A flow cytometric study. **Avian Dis 41**: 312-316, 1997.

Pereira, H.G.; Azeredo, R.S.; Leite, J.P.G.; Candeias, J.A.N.; Racz, M.L.; Linhares, A.C.; Gabbay, Y.B. & Trabulsi, J.R. Electrophoretic study of the genome of human rotaviruses from Rio de Janeiro, São Paulo and Pará, Brazil. **J. Hyg. 90:**117-125,1983.

Petek, M.; D'Aprile, N. & Cancellotti, F. Biological and physico-chemical properties of the infectious bursal disease (IBDV). **Avian Pathol. 2**: 135-152, 1973.

Pitcovski, J. Goldberg, B.Z.; Levi, T.; Castro, D.D.; Azriel, A. ; Krispel, S.; Maray, T. and Shaaltiel, Y. Coding region of segment A sequence of a very virulent isolate of IBDV - Comparison with isolates from different countries and virulence. **Avian Dis. 42**: 497-506, 1998.

Pitcovski, J.; Levi, D.D., Maray T.; Castro, D.D.; Safadi, A.; Krispel, S.; Azriel, A.; Gutter, B. and Michael, A. Failure of viral protein 3 of IBDV produced in prokaryotic and eukariotic expression systems to protect chickens against the disease. **Avian Dis. 43**: 8-15, 1999.

Preez, J.H. Control del vvIBDV en Sudáfrica. **World Poultry (supl.):** 17-18, 1995.

Ramos, A.P.D.; Stefanelli, C.C.; Linhares, R.E.C.; Brito, B.G.; Santos, N.; Gouvêa, V. Lima, R.C. and Nozawa, C. The stability of porcine rotavirus in feces. **Vet. Microbiol. 71**: 1-8, 2000.

Reed, J.H. & Muench, H. A simple method for estimating fifty percent endpoints. **Amer. J. Hyg. 27**: 493-496, 1938.

Reddy, S.K. & Silim, A Comparison of neutralizing antigens of recent isolates of IBDV. **Arch Virol, 117**: 287-296, 1991.

Robertson, M.D. & Wilcox, G.E. Avian reovirus. **Vet. Bull. 56**: 155-174, 1986.

Rosemberger, J.K. & Olson, N.O. Viral arthritis. In: B.W Calnak, H.J.; Barnes, C.W.; Beard, W.M. & Yoder, H.W (Eds.), **Disease of Poultry**, 9 ed. Iowa State University Press, Ames, 10, pp. 711-719, 1997.

Sánches, A.B. & Rodrigues, J. F. Proteolytic processing in infectious bursal disease virus: identification of the polyprotein cleavage sites by site-directed mutagenesis. **Virol. 262**: 190-199, 1999.

Sapats, S.I. & Ignjatovic, J. Antigenic and sequence heterogeneity of infectious bursal disease virus isolated in Austrália **Arch. Virol. 145**: 773-85, 2000.

Schnitzler, D.; Bernstein, F.; Müller, H. and Becht, H. The genetic basis for the antigenicity of the VP2 protein of the infectious bursal disease virus. **J. Gen. Virol. 74**: 1536-1571, 1993.

Schroder, A.; van Loon, A.A.; Goovaerts, D. and Mundt, E. Chimeras in noncoding regions between serotypes I and II of segment A of infectious bursal disease virus are viable and show pathogenic phenotype in chickens. **J. Gen. Virol. 81(2)**: 533-40, 2000.

Sharma, J. M. & Lee, L.F. Effect of infectious bursal disease virus on natural killer cell activity and mitogenic response of chicken lymphoid cells: Role of adherent cells in cellular immune suppression. **Infect Immun. 42**: 747-754, 1983.

Sellers, H.S. ; Villegas, P.N.; Seal, B.S. and Jackwood, D.J. Antigenic and molecular characterization of three infectious bursal disease virus fields isolates. **Avian Dis. 43**: 198-206, 1999.

Skeeles, J.K.; Lukert, P.D.; Buysscher, E.V.De; Fletcher, O.J. & Brown, J. Infectious bursal disease viral infections II. The relationship of age, complement levels, virus-neutralizing antibody, clotting and lesions. **Avian Dis. 23**: 107-117, 1979.

Smith, A.L., Tgnor, G.H. & Mifune, K. Isolation and assay of rabies serogroups viruses in CER cells. **Intervirol. 8**: 92-99, 1977.

Takata, C.S.; Kubrusly, F.S.; Miyaki, C; Mendes I.F. and Rizzo E. Suscetibilidade da linhagem de células Vero a cepas vacinais do vírus do sarampo. **Ver. Saúde Pública 28**: 209-212, 1994.

Tham, K.M., Young, L.W. & Moon, C.D. Detection of Infectious bursal disease virus by reverse transcription-polymerase chain reaction amplification of the virus segment A gene. **J. Virol. Methods 53**: 201-212, 1995.

Tham, K.M. and Moon, C.D. Apoptosis in cell culture induced by infectious bursal disease virus following in vitro infection. **Avian Dis. 40**:109-113, 1996.

Tsukamoto, K.; Tanimura, N.; Hihara, H.; Shiraj, J.; Imai, K.; Nakamura, K. and Maeda, M. Isolation of virulent infectious bursal disease virus from outbreaks with high mortality in Japan. **J. Vet. Med. Sci. 54**: 153-155, 1992.

Tsukamoto, K.; Tanimura, N.; Kakita, S.; Ota, K.; Mase, M.; Imai, K. and Hihara, H. Efficacy of three live vaccines against highly virulent infectious bursal disease virus in chickens with or without maternal antibodies. **Avian Dis. 39**: 218-229, 1995.

Ture, O; Tsai, H.J. and Saif, Y.M. Studies of antigenic relatedness of classic and variant strains of infectious bursal disease virus. **Avian Dis 37**: 647-654, 1993.

Ture, O. and Saif, Y.M Structural proteins of classic and variant strains of infectious bursal disease virus. **Avian Dis 36**: 829-836, 1992.

van den Berg, T.P.; Gonze, M. and Meulemans, G. Acute infectious bursal disease in poultry: isolation and characterization of a highly virulent strain. **Avian Pathol. 20:** 133-43, 1991.

Winiarczyk, S. and Gradzki, Z. Comparison of polymerase chain reaction and dot hybridization with enzyme-linked immunoassay, virological examination and polyacrylamide gel electrophoresis for the detection of porcine rotavirus in faecal specimens. **Zentralbl Vet.(B) 46(9):** 623-634, 1999.

Winterfield, R.W. & Hitchner, S.B. Etiology of an infectious nephritis-nephrose syndrome of chickens. **Am. J. Vet. Res. 23**: 1273-1279, 1962.

Winterfield, R.W.; Fadly, A.M. and Bickford, A. Infectivity and distribution of infectious bursal disease virus in the chicken. Persistence of the virus and lesions. **Avian Dis. 16**:622-632, 1972.

Winterfield, R.W.; Hitchner, S.B.; Appleton, G.S. and Cosgrove, A.S. Avian nephosis, nephritis and Gumboro disease. **L & M News and Views 3**: 103, 1962.

Yamaguchi, T.; Kondo, T.; Inoshima, Y.; Ogawa, M.; Miyoshi, M.; Yanai, T.; Masegi, T.; Fukushi, H. and Hirai, K. In vitro attenuation of highly virulent infectious bursal disease virus: Some characteristics of attenuated strains. **Avian Dis., 40**: 501-509, 1996.

Yao, K. and Vakharia, V.N. Generation of infectious pancreatic necrosis virus from cloned cDNA. **J. Virol. 72**: 8913-8920, 1998.

Zierenberg, K.; Nieper, H.; van den Berg, T.P.; Ezeokoli, C.D.; Voss, M. and Muller, H. The VP2 variable region of African and German isolates of infectious bursal disease virus: comparison with very virulent, 'classical' virulent, and attenuated tissue culture-adapted strains. **Arch Virol. 145**: 113-125, 2000.