

**UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE
CAMPINAS**

doutorado

BC/51900

IB/ 81862

INSTITUTO DE BIOLOGIA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



LOURDES MARIA ARAUJO QUARESMA DE CAMARGO

**EFEITO DA ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA SOBRE O PNEUMOVÍRUS
AVIÁRIO: QUEDA DA INFECTIVIDADE E MANUTENÇÃO DA
IMUNOGENICIDADE**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Loures Maria Araujo
Quaresma de Camargo
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção de título de
Doutor em Genética e Biologia
Molecular na área de Microbiologia.

Orientadora: Profa. Dra. CLARICE WEIS ARNS

2002

UNIDADE	IP/81802
Nº CHAMADA	UNICAMP
	C14e
V	EX
TOMBO BC/	51900
PROC.	10 31
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 1,00
DATA	11/11/02
Nº CPD	

CM00177099-1

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

C14e **Camargo, Lourdes Maria Araujo Quaresma de**
 Efeito da alta pressão hidrostática sobre o pneumovírus aviário:
 queda da infectividade e manutenção da imunogenicidade/Lourdes
 Maria Araujo Quaresma de Camargo. --
 Campinas, SP: [s.n.], 2002.

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

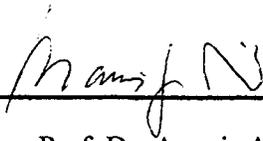
1.Pneumovírus. 2.Vacina. 3.Vírus-inativação. I. Arns, Clarice
 Weis. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.
 III. Título.

Campinas 24 de setembro de 2002

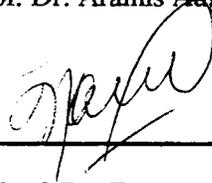
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dra. Clarice Weis Arns



Prof. Dr. Aramis Augusto Pinto



Prof. Dr. Tomomasa Yano



Prof. Dr. Mauro Santos Villas-Boas



Prof. Dra. Liana Cardoso Verinaud

Prof. Dra. Gleize Vilela Carbonell

Prof. Dra. Nilce Correa Meirelles

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus que me permitiu começar e terminar este trabalho. Agradeço também por ter colocado no meu caminho todas as pessoas que de alguma forma estiveram envolvidas na realização deste projeto.

À Profa. Dra. Clarice Weis Arns pelas intermináveis palavras de incentivo, pela confiança e apoio que transcendem a orientação.

Ao Prof. Dr. Carlos Bonafé pela orientação, pelo valioso treinamento e por ter permitido a utilização de equipamentos e instalações do Laboratório de Termodinâmica de Proteínas do Depto. de Bioquímica do IB/UNICAMP.

Às minhas amigas do laboratório que me ensinaram tudo. Agradeço a todas pela constante ajuda e paciência: Jaqueline, Maria Ângela, Terezinha, Lia, Lica, Célia, Gonçala, Regina e Renata.

Aos meus amigos pessoais pelo apoio, carinho e incentivo, mas agradeço especialmente pelo exemplo de determinação e clareza de objetivos que cada um deles representa para mim: Neusa Maria, Magda, Rossana, Tânia, Rosiani, Mab, Mauro, e ao Guardião do protocolo sagrado.

Aos professores e pesquisadores que contribuíram na minha formação de forma única: Dr. Otávio Camargo, Dr. Caio Cardoso, Dr. Sebastião Iaria e especialmente à Dra. Pilar Massaguer por ter se dedicado em me consertar.

Aos queridos professores Liana Verinaud, Alda Backs Noronha e José Antonio Jerez pelas valiosíssimas contribuições que abrilhantaram este trabalho.

Aos meus amigos do Anilab: Rubens e Alê.

Aos professores e colegas do Departamento de Microbiologia e Imunologia do IB/UNICAMP.

Aos meus três braços direitos do Lab. Genius (Flávio, Moacir e Rodrigo) pelo amor e confiança.

A todos meus amigos da Baumer, minha segunda família.

Aos meus alunos e alunas da FESB que me ensinam a mudar sempre para me manter jovem.

Agradeço eternamente ao Renato pela compreensão, amizade e presença nas horas necessárias.

Agradeço de forma especial e ofereço esta tese aos meus pais (Nelito e Lourdes) e meus queridos irmãos (José Manoel e Graça).

Dedico este trabalho aos meus amados sobrinhos: Victor, Mariana, Marta, Camila, Arthur e Felipe.

LISTA DE ABREVIATURAS	6
RESUMO.....	7
1 INTRODUÇÃO	9
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	11
2.1 <i>O PNEUMOVÍRUS AVIÁRIO.....</i>	<i>11</i>
2.2 <i>A SINDROME DA CABEÇA INCHADA DE GALINHAS (SCI)</i>	<i>14</i>
2.3 <i>A ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA</i>	<i>16</i>
2.3.1 <i>Efeito da alta pressão hidrostática na inativação de partículas virais.....</i>	<i>18</i>
2.3.2 <i>Efeito da alta pressão hidrostática sobre a imunogenicidade de partículas virais.....</i>	<i>20</i>
3 OBJETIVOS	22
3.1 <i>OBJETIVO GERAL.....</i>	<i>22</i>
3.2 <i>OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</i>	<i>22</i>
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	24
4.1 <i>MÉTODOS GERAIS PARA CÉLULAS E VÍRUS.....</i>	<i>24</i>
4.1.1 <i>Amostras virais</i>	<i>24</i>

4.1.2	<i>Células.....</i>	24
4.1.3	<i>Produção de antígeno</i>	24
4.1.4	<i>Titulação das amostras virais.....</i>	25
4.2	<i>EFEITO IN VITRO DA ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA SOBRE O PVA</i>	25
4.2.1	<i>Equipamento para aplicação de alta pressão hidrostática.....</i>	25
4.2.2	<i>Efeito do aumento da alta pressão hidrostática na redução da infectividade do PVA</i>	27
4.2.3	<i>Efeito do tempo de exposição a 250 MPa na redução da infectividade do PVA....</i>	28
4.3	<i>EFEITO IN VITRO DA BETAPROPIOLACTONA (BPL) SOBRE O PVA</i>	29
4.3.1	<i>Efeito da concentração de BPL na redução da infectividade do PVA.....</i>	29
4.3.2	<i>Efeito da BPL combinada com alta pressão hidrostática na redução da infectividade do PVA.....</i>	29
4.4	<i>EFEITO DA ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA NA IMUNOGENICIDADE DO PVA – ESTUDOS IN VIVO.....</i>	30
4.4.1	<i>Determinação da resposta imune em aves inoculadas com amostras de PVA inativadas com alta pressão hidrostática</i>	30
4.4.2	<i>Teste de soroneutralização.....</i>	31

4.5	<i>EFEITO DA BETAPROPIOLACTONA NA IMUNOGENICIDADE DO PVA.....</i>	33
4.5.1	<i>Determinação da resposta imune de aves SPF inoculadas com amostras de PVA inativadas com BPL e de aves inoculadas com amostras de PVA inativadas com a combinação de BPL e exposição à alta pressão hidrostática</i>	33
4.6	<i>EFEITO DA ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA NA IMUNOGENICIDADE DO PVA. ESTUDO DE CAMPO. DESAFIO COM AMOSTRA VIRULENTA DE PVA (SHS-119-BR)</i>	34
4.6.1	<i>Teste de ELISA.....</i>	36
5	RESULTADOS.....	37
5.1	<i>PRODUÇÃO E TITULAÇÃO VIRAL.....</i>	37
5.2	<i>EFEITO IN VITRO DA ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA SOBRE O PVA.....</i>	37
5.2.1	<i>Efeito do aumento da alta pressão hidrostática na redução da infectividade do PVA</i>	37
5.2.2	<i>Efeito do tempo de exposição a 250 MPa na redução da infectividade do PVA</i>	38
5.3	<i>EFEITO IN VITRO DA BETAPROPIOLACTONA NA INATIVAÇÃO DO PVA</i>	42

5.3.1	<i>Efeito da concentração de BPL na redução da infectividade do PVA</i>	42
5.3.2	<i>Efeito da BPL combinada com alta pressão hidrostática na redução da infectividade do PVA</i>	43
5.4	<i>EFEITO DA ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA NA IMUNOGENICIDADE DO PVA – ESTUDOS IN VIVO</i>	45
5.4.1	<i>Determinação da resposta imune em aves inoculadas com amostras de PVA inativadas com alta pressão hidrostática</i>	45
5.5	<i>EFEITO DA BETAPROPIOLACTONA NA IMUNOGENICIDADE DO PVA</i>	46
5.5.1	<i>Determinação da resposta imune de aves SPF inoculadas com amostras de PVA inativadas com BPL e de aves inoculadas com amostras de PVA inativadas com a combinação de BPL e exposição à alta pressão hidrostática</i>	46
5.6	<i>EFEITO DA ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA NA IMUNOGENICIDADE DO PVA. ESTUDO DE CAMPO. DESAFIO COM AMOSTRA VIRULENTE DE PVA (SHS-119-BR)</i>	48
6	DISCUSSÃO	53
6.1	<i>ESTUDOS IN VITRO</i>	53

6.2	<i>ESTUDOS IN VIVO</i>	60
7	CONCLUSÕES	69
7.1	<i>CONCLUSÃO GERAL</i>	69
7.2	<i>CONCLUSÕES ESPECÍFICAS</i>	69
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73

LISTA DE ABREVIATURAS

BMV	- vírus do mosaico do capim marron
BPL	- β -propiolactona (beta)
CER	- Chicken Embryo Related
ELISA	- ensaio imunoenzimático
FMDV	- vírus da febre aftosa
HCMV	- citomegalovírus humano
HHP	- alta pressão hidrostática
HIV	- vírus da imunodeficiência humana
HSV	- vírus do herpes simples humano
IBDV	- vírus da doença infecciosa da bursa
i.m.	- via intramuscular de administração de drogas
Log	- logaritmo de base 10 (referente a um ciclo logarítmico neste trabalho)
MMEE	- meio mínimo essencial de Eagle
Mpa	- mega pascal (0,1 MPa = 1,013 bar = 1 atm = 1,033 kg/cm ²)
PVA	- pneumovírus aviário
s.c.	- via subcutânea de administração de drogas
SCI	- síndrome da cabeça inchada
SFB	- soro fetal bovino
SIV	- vírus da imunodeficiência símia
SN	- teste de soroneutralização
SPF	- "Specific pathogen free"
TMV	- vírus do mosaico do tabaco
TRT	- rinotraqueíte de perus
VSV	- vírus da estomatite vesicular

RESUMO

A virologia animal empenha-se constantemente na busca e desenvolvimento de novas vacinas para garantir a qualidade sanitária e prevenir perda econômica de plantéis aviários. Entre as doenças respiratórias que afetam as galinhas, encontra-se a Síndrome da Cabeça Inchada (SCI), que está associada ao pneumovírus aviário (PVA). No presente trabalho foi estudado o efeito da alta pressão hidrostática (HHP) sobre o PVA observando o padrão de redução na infectividade e manutenção da imunogenicidade da partícula viral, visando avaliar o potencial deste método para preparações virais inativadas. Foi utilizada uma estirpe de PVA isolada no Brasil, parcialmente purificada. A primeira etapa do trabalho teve por objetivo conhecer a cinética de inativação do PVA pela alta pressão através da exposição da suspensão viral a faixa de 50 a 300 MPa (Mega Pascal), seguida pela exposição por diferentes tempos a uma pressão fixa de trabalho. A queda de infectividade foi determinada utilizando-se cultivo em células da linhagem CER (Chicken Embryo Related). Os resultados indicaram que a exposição do PVA por 60 minutos a uma faixa de pressão de 50 a 300 MPa (Mega Pascal) conduziu a redução de 0,3 a 4 log (respectivamente) da infectividade da suspensão viral com concentração inicial de $1 \times 10^{6,5}$ DICT50/ml. A exposição por mais de 100 minutos a 250 MPa resultou em queda $> 5,5$ log no título viral inicial, tendo sido observado que há aumento na inativação da partícula em função do tempo de exposição à pressão. Na segunda etapa do trabalho, foi determinado o padrão de resposta imune produzido em galinhas SPF ("specific pathogen free") de 21 dias de idade inoculadas com uma amostra de PVA pressurizada por 120 minutos a 250 MPa. O padrão de resposta imune obtido foi comparado ao de galinhas inoculadas com suspensão de PVA inativada com betapropiolactona e com galinhas inoculadas com amostra virulenta de PVA (não inativada). Os títulos de anticorpos soroneutralizantes obtidos nos grupos estudados indicaram que a pressão não altera a imunogenicidade do PVA uma vez que a partícula inativada pela pressão é capaz de produzir o mesmo padrão de resposta imune que a partícula quimicamente inativada e a partícula nativa (IC 95%). Na terceira etapa, foram utilizadas galinhas de 51 dias de idade mantidas por cinco meses em um criadouro, simulando condições de campo. Após imunização com amostra inativada pela pressão as aves foram desafiadas com estirpe de PVA selvagem. A resposta imune das aves foi

acompanhada pelos testes de ELISA e de soroneutralização até a fase de postura. O padrão de soroconversão observado indicou que a alta pressão foi capaz de inativar as partículas de PVA sem contudo ter alterado suas estruturas imunológicas e funcionais de modo a produzir uma resposta imune em galinhas igual (IC 95%) à desenvolvida em as aves inoculadas com amostras virais não pressurizadas. Os resultados obtidos foram comparáveis aos relatados para vacinas atenuadas e inativadas, sugerindo fortemente que a HHP pode ser uma alternativa para produção de vacinas virais inativadas para o PVA.

1 INTRODUÇÃO

A compreensão das interações “proteína-proteína” e “proteína-ácido nucléico” é de extremo interesse para a virologia, uma vez que estes fenômenos também estão diretamente envolvidos na replicação e montagem de partículas virais. A aplicação de faixas moderadas de pressão hidrostática (até 300 MPa) não produz efeito significativo sobre a estrutura de ácidos nucléicos ou proteínas de cadeia simples. Desde os anos 50, havia relatos do fenômeno da dissociação de proteínas oligoméricas e de capsídeos virais quando expostos à pressão. Nesta época um grupo de pesquisa do Instituto Pasteur de Paris liderado por Dr. Basset chegou a propor o preparo de uma vacina anti-poliomielite a partir do vírus inativado por HHP. O projeto foi abandonado por razões econômicas assim que a vacina Sabin foi lançada (MASSON, 2001).

Recentemente, tem despertado um grande interesse o conhecimento do efeito da HHP sobre diversos vírus. Tem sido relatada a inativação completa, após aplicação de ciclos de pressurização e despressurização, para alguns vírus como o vírus da imunodeficiência humana e o citomegalovírus humano (NAKAGAMI et al., 2000), vírus do herpes simples humano (NAKAGAMI et al., (1992), e para o vírus da imunodeficiência símia (JURKIEWICKZ et al., 1995). Para outros vírus, como o rotavírus bovino (PONTES da SILVA, 1999), o vírus da estomatite vesicular (SILVA et al., 1992), e o vírus da doença infecciosa da bursa em aves (TIAN et al., 2000) tem sido experimentalmente demonstrado que além da perda da infectividade a partícula preserva a imunogenicidade.

A sensibilidade das partículas virais à alta pressão hidrostática, conforme demonstrado nos trabalhos citados, tem motivado o uso dessa metodologia para produção de vacinas inativadas, embora até o momento não tenha sido relatada a produção de vacina utilizando este procedimento. Entretanto, os dados encontrados na crescente literatura sobre o assunto têm demonstrado que a alternativa é válida, principalmente por ser um método eficaz e seguro (JURKIEWICZ et al., 1995; PONTES da SILVA 1999; OLIVEIRA et al., 1997).

Por ser um método físico, a HHP tem algumas vantagens sobre os demais tradicionais métodos de preparação de vacinas, ou seja, a não introdução de um agente químico exógeno em contato com o operador ou com o animal, ou a manutenção da partícula íntegra, além de ser um método simples e mais prático do que passagens consecutivas em células, e, hoje em dia, mais barato do que a produção de vacinas de peptídeos sintéticos.

Neste trabalho foi utilizado o pneumovírus aviário (PVA), agente causal associado à síndrome da cabeça inchada de galinhas (SCI), como modelo para se estudar o efeito da HHP sob a infectividade e manutenção da imunogenicidade da partícula viral.

As perdas econômicas em frangos de corte provocadas pela SCI, da ordem de 1 a 3% em condições favoráveis e 20 a 30% quando ocorrem complicações respiratórias ou infecções secundárias, por si só justificam a realização desse estudo.

A pesquisa de novas vacinas para o PVA tem se intensificado nos últimos anos principalmente devido ao isolamento e identificação de novos sorotipos, o que torna presente a necessidade de alternativas rápidas para o controle e profilaxia da doença que é responsável por perdas econômicas significativas para a indústria avícola, um setor de grande importância para a economia mundial (GOUCH, 2000; EASTON, 1997).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *O Pneumovírus Aviário*

O Pneumovírus Aviário (PVA) ou vírus da rinotraqueíte dos perus (TRTV) pertence à família *Paramyxoviridae*. Por não possuir as proteínas não estruturais NS1 e NS2, e sim M2 com características estruturais semelhantes a outros pneumovírus, foi proposto que o PVA passe a constituir o vírus padrão de um novo gênero, denominado *Metapneumovirus* (SEAL et al., 2000).

O PVA é responsável por infecções agudas no trato respiratório superior de perus e, em galinhas, está associado com problemas respiratórios e com a síndrome da cabeça inchada (SCI) (NAYLOR & JONES, 1993).

O PVA é um vírus de RNA de fita simples de sentido negativo, de aproximadamente 15 kb de comprimento. Os vírions são pleomórficos, embora predomine a forma esférica, com tamanho variando entre 70 a 600 nm de diâmetro, conforme evidenciado em estudos da morfologia desta partícula através da técnica de microscopia eletrônica de transmissão por contraste negativo (WYETH et al., 1987; GIRAUD et al., 1986; GOUCH & COLLINS, 1989).

Na Figura 1 pode-se observar uma ilustração do PVA evidenciando algumas das estruturas principais da partícula, como o envoltório lipoprotéico de onde emergem projeções medindo em torno de 13 a 15 nm de comprimento (WIETH et al., 1987; COLLINS et al., 1993; EASTON 1997). O genoma do PVA é composto por 10 genes que expressam duas proteínas não estruturais (NS1 e NS2), uma nucleoproteína (N), uma fosfoproteína (P), duas proteínas de matriz (M e M2), uma pequena proteína hidrofóbica (SH), uma glicoproteína de adesão (G), uma proteína de fusão (F), e uma RNA polimerase dependente do RNA viral (L) (SEAL, 1998; SEAL et al., 2000).

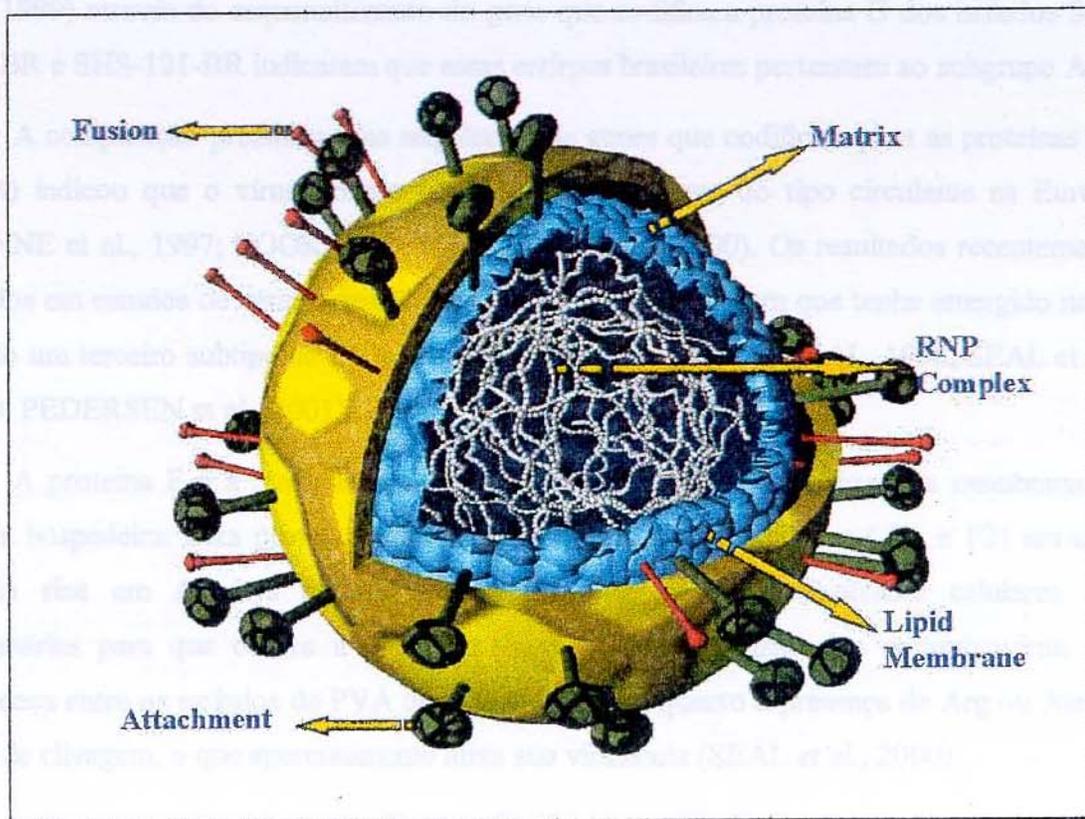


Figura 1. Ilustração do Pneumovírus aviário indicando as glicoproteínas de fusão (fusion) e adesão (attachment) ancoradas na membrana lipídica (lipid membrane), bem como o complexo de RNA polimerase (RNP complex) e a proteína da matriz (matrix). (Fonte: Easton, 1997)

A proteína G dos pneumovírus é responsável pela adesão celular e é o maior determinante antigênico do vírus. Com base nos nucleotídeos e seqüências de aminoácidos do gene que codifica para proteína G, e, através de ensaios de neutralização cruzada com anticorpos mono e policlonais, dois subgrupos de PVA denominados A e B foram identificados (JUHAZ & EASTON, 1994; SENNE et al., 1997; PEDERSEN et al., 2001).

Ao subgrupo A pertencem os vírus descritos e isolados no Reino Unido, França e África do Sul antes de 1993, enquanto que ao subgrupo B pertencem os vírus do continente europeu – atualmente encontrados no Reino Unido, Espanha, Hungria e Itália (NAYLOR et

al., 1997; SEAL, 1998; SEAL et al., 2000). No Brasil, os resultados obtidos por DANI et al., (1999) através do sequenciamento do gene que codifica a proteína G dos isolados SHS 119-BR e SHS-121-BR indicaram que essas estirpes brasileiras pertencem ao subgrupo A.

A comparação preliminar das seqüências de genes que codificam para as proteínas (F) e (M) indicou que o vírus isolado nos EUA era diferente do tipo circulante na Europa (SENNE et al., 1997; COOK et al., 1999; SEAL et al., 2000). Os resultados recentemente obtidos em estudos de caracterização do PVA dos EUA sugerem que tenha emergido nesta região um terceiro subtipo de PVA – o tipo C (DAR et al., 2001; SEAL, 1998, SEAL et al., 2000; PEDERSEN et al., 2001).

A proteína F é a mediadora da fusão entre a membrana do vírus e a membrana da célula hospedeira. Esta proteína sofre clivagem em duas subunidades (F1 e F2) em uma região rica em Arg-Lys denominada peptídeo de conexão. Proteases celulares são necessárias para que ocorra a clivagem das proteínas de fusão dos paramixovírus. Há diferença entre os isolados de PVA dos EUA e Europa quanto à presença de Arg ou Ala no sítio de clivagem, o que aparentemente afeta sua virulência (SEAL et al., 2000).

O teste de soroneutralização é uma das técnicas que tem sido utilizadas para identificar o PVA e outros vírus, para determinar a relação antigênica de diferentes isolados virais e para a identificar e quantificar anticorpos neutralizantes. Os ensaios de neutralização são realizados em substratos vivos (ovos embrionados, cultura de células) e são baseados no princípio segundo o qual o anticorpo liga-se em um vírus específico com neutralização resultante da infectividade ou ação viral sobre um determinado substrato. Como método de diagnóstico, monitoração e pesquisa em patologia aviária, esse método tem sido bastante utilizado pela sua sensibilidade e especificidade. Essa técnica é capaz de detectar anticorpos IgG e IgM (MONTEIRO, 2001).

O teste de ELISA (ensaio imunoenzimático) também tem sido bastante empregado na determinação do perfil sorológico e monitoração epidemiológica de aves. Diversos “kits” comerciais foram desenvolvidos para o PVA utilizando antígenos isolados no Reino Unido e na França (BAXTER-JONES et al., 1986; CHETTLE et al., 1990; GRANT et al., 1997). O ELISA tem sido bastante recomendado no diagnóstico e monitoração viral por fornecer

resultados confiáveis e comparáveis aos de outros testes sorológicos, além de sua fácil execução, rapidez e custo, o que permite o exame de um grande número de amostras (MONTEIRO, 2001).

2.2 *A Síndrome da Cabeça Inchada de galinhas (SCI)*

Em 1978 foi realizado na África do Sul o primeiro isolamento do PVA, que foi então associado, como agente causal de uma doença respiratória atípica de perus (BUYS & Du PREEZ, 1980; MORLEY & THOMSON, 1984).

Os primeiros relatos da síndrome da cabeça inchada observando sintomatologia em frangos de corte foram feitos por MORLEY & THOMPSON (1984) na África do Sul, e por DIAZ de ESPADA & PERONA (1984) na Espanha. Neste quadro as aves apresentavam inchaço na face mais visível ao redor dos olhos, de onde derivou o nome da doença. Os mesmos sintomas foram relatados em galinhas na França; em matrizes na Inglaterra, em Israel, em Marrocos, no Canadá e no México; em matrizes e frangos de corte na Alemanha, no Brasil, na Inglaterra, em Marrocos, na Noruega, na Tailândia; em frangos, matrizes e poedeiras na China, no Japão e na Noruega, e em frangos de corte no Chile (CHETTLE, 1991; WILLIAMS et al., 1991; ARNS & HAFEZ, 1992; LU et al., 1994; TANAKA et al., 1995; OTSUKI et al., 1996).

Acredita-se que o PVA tenha sido encontrado originalmente em galinhas de Angola nativas da África do Sul e se adaptado em perus e galinhas, e em seguida tenha se disseminado através dos continentes. Esses vírus já foram isolados e detectados sorologicamente na Europa (O'BRIEN, 1985; PATTISON et al., 1989; HAFEZ & LOHREN, 1990) na Ásia (URAMOTO et al., 1990; LU et al., 1994), na América do Norte (DROUAL et al 1990) e América do Sul (ARNS & HAFEZ, 1992).

No Brasil, a presença da SCI foi relatada por ARNS & HAFEZ, (1992), PARREIRA (1994), SILVA et al, (1994) e COSWIG (1998) em diferentes regiões do país em matrizes, poedeiras e frango de corte.

A infecção paralela com outras bactérias tem sido considerada uma característica da ave com SCI.. Alguns autores relatam que a *Escherichia coli* tem um papel especial quando ocorre como agente secundário (SILVA et al., 1994; PARREIRA, et al., 1998), porém já foram citados outros agentes como *Bordetella avium*, *Mycoplasma gallisepticum* (NAYLOR & JONES, 1994) e *Mycoplasma imitans* (GANAPATHY et al., 1998). Há indicações de que a replicação dos vírus nessas condições aumenta a incidência de lesões mais graves e também aumenta o número de bactérias isoladas (VAN de ZANDE et al., 2001).

Não estão muito esclarecidos os fatores envolvidos no desenvolvimento de ambiente favorável para a colonização bacteriana após a infecção com PVA. A colonização bacteriana é provavelmente estimulada pelas alterações histopatológicas que são observadas nos primeiros dias após a infecção viral (MAJÓ et al., 1995; VAN de ZANDE et al., 2001). Estas alterações, que são caracterizadas pela perda da integridade das células do epitélio respiratório (p.ex.: esfoliação do epitélio e perda de cílios), cessam de 10 a 14 dias após a infecção. As alterações degenerativas e regenerativas durante a replicação do PVA, aliada à resposta imunológica podem ser responsáveis pela indução de receptores de superfície para a *E. coli*, permitindo a colonização do ambiente pela bactéria (VAN de ZANDE et al., 2001).

Os sinais clínicos iniciais da SCI incluem a descarga de um exudato aquoso seguido de um exudato seroso pela narina, tosse, espirro, respiração pela boca e inchaço do espaço intraorbital. Em uma primeira fase, a SCI é uma doença leve não necessariamente do trato respiratório, com alta morbidade repentina. Ao atingir uma segunda fase, a ave doente apresenta sinais clínicos mais severos podendo ocorrer 90% de mortalidade. Antibioticoterapia ajuda a controlar esta segunda fase (EASTON, 1997; PEDERSEN et al., 2001). A gravidade dos sintomas, a duração da doença, e a mortalidade são extremamente variáveis. Estes fatores são influenciados pelo tipo de infecção bacteriana associada e por variáveis ambientais como precárias condições de manejo e higiene, ventilação inadequada, alta densidade de aves, alto nível de amônia e flutuação de temperatura na área (HAFEZ, 1990; GOUCH, 2000; EASTON, 1997).

Os programas de vacinação têm sido rotina nos países onde há a presença do PVA relacionado com doença respiratória em perus e galinhas. Esta prática de vacinação de aves comerciais tem melhorado significativamente a situação de perdas econômicas por minimizar a doença clínica, mortalidade e perdas por queda na postura (JONES, 1996).

Na prevenção da SCI são empregadas vacinas de vírus atenuados ou vacinas de vírus quimicamente inativados. Vacinas de vírus atenuados dos subtipos A e B tem sido aplicadas em perus, isoladamente ou combinada com outras vacinas. Os procedimentos compreendem vacinação das aves com um dia de idade seguida de dois reforços: aos 7-10 dias e entre 4 a 6 semanas. Essa estratégia produz imunidade celular, mas reações adversas ocorrem devido a infecções secundárias. Em matrizes, vacinas de vírus inativados têm sido empregadas entre 16 a 20 semanas e durante a postura. A vacinação de galinhas varia dependendo da situação de cada granja (COOK et al., 1989; GOUGH, 2000).

Atualmente nos Estados Unidos está sendo avaliada a possibilidade de uso de vacinas de peptídeos sintéticos do gene F, baseado nos sistemas de Baculovírus, ou outros vetores como o vírus da doença de Newcastle ou vírus do herpes de perus. Essa abordagem teria a vantagem de não utilizar PVA atenuado, mas o impacto ambiental deste procedimento deve ainda ser avaliado. Outras abordagens têm se dirigido à melhoria das vacinas atenuadas sem perda da imunogenicidade e aumento do título viral em cultivo celular (GOUGH, 2000).

2.3 A Alta Pressão Hidrostática (HHP)

A perturbação causada pela alta pressão hidrostática não altera o conteúdo energético do sistema, deslocando o equilíbrio entre as formas nativas e estruturalmente alteradas de uma proteína na direção desta última. Em geral, na faixa de interesse biotecnológico (700 MPa), a pressão causa o rompimento de ligações não covalentes, principais responsáveis

pela manutenção da estrutura nativa de uma proteína. Em função desta ação sobre estruturas estabilizadas por ligações não covalentes, a pressão age sobre membranas e montagens macromoleculares. As interações hidrofóbicas são as ligações mais fracas envolvidas na estabilidade de proteínas, de micelas e lipídeos que são alterados de modo diferente pela pressão. Ligações iônicas são rompidas pela pressão e a ionização de sais, ácidos e bases e a auto-ionização da água sofrem aumento sob pressão. Ácidos nucleicos e açúcares são resistentes à pressão porque sua estrutura secundária é principalmente estabilizada por pontes de hidrogênio que não são afetadas drasticamente pela pressão (WEBER, 1986, 1992; SILVA & WEBER, 1993; SUAREZ, 1995).

A utilização da pressão hidrostática em sistemas biológicos, sejam eles oligoméricos ou estruturas virais formadas por capsídeo protéico, permite a compreensão de uma variedade de processos físicos e químicos, que norteiam a interação proteína-proteína, durante o fenômeno de dissociação e re-associação (PONTES, 1991).

Quando expostas à pressão, proteínas oligoméricas e alguns vírus sofrem a dissociação de subunidades protéicas, que pode ser seguida de re-associação parcial ou completa quando em descompressão. A essa nova reorganização, nova conformação após pressurização destinou-se o termo “deriva conformacional”. As diferenças observadas na reversibilidade da dissociação e na re-obtenção das propriedades nativas são determinadas pelo número de subunidades e pela complexidade das interações nos agregados protéicos originais. O fato de que estas subunidades estejam passando por modificações estruturais durante deriva conformacional quando não estão em contato umas com as outras, pode ser uma explicação para estas observações (WEBER, 1986, 1993). O aparecimento de partículas defectivas depois de pressurização pode ser considerado um fenômeno análogo ao que ocorre com oligômeros que sofreram deriva conformacional. Porém, partículas virais apresentam complexidades adicionais que não estão presentes em proteínas oligoméricas, entre elas, interações do capsídeo com ácido nucleico e interações do capsídeo com lipídeos associados à membrana em vírus que apresentam envoltório lipoprotéico e, como resultado, espera-se irreversibilidade completa dos efeitos da alta pressão em vírus com envoltório (SILVA et al., 1992).

2.3.1 Efeito da alta pressão hidrostática na inativação de partículas virais

As primeiras tentativas de estimar a sensibilidade de partículas virais à pressão foram relatadas em 1929 no trabalho de GIDDINGS et al., (1929, apud FDA CFSAN, 2000). Neste estudo foi observado que pressão da ordem de 920 MPa foi necessária para gerar inativação de suspensões do vírus do mosaico do tabaco (TMV).

Os relatos encontrados na literatura mostram que diferentes vírus apresentam graus diferentes de resistência à pressão, sendo que para a maioria dos vírus estudados o grau de dissociação e inativação da partícula viral depende do tempo de incubação à pressão (GASPAR, 2000).

SILVA & WEBER (1988) relataram que para o vírus do mosaico do capim marrom, (BMV) foi observada maior taxa de dissociação da partícula com o aumento da pressão. Após exposição da suspensão viral a 220MPa, não foi observada reassociação total das partículas. Estudos de microscopia eletrônica evidenciaram a presença de um material gelatinoso provavelmente proveniente da alteração do agregado das subunidades pela pressão.

BRAUCH et al., (1990) relataram que alguns bacteriófagos de DNA foram significativamente inativados pela exposição à pressão entre 300 a 400 MPa combinada com temperatura (40°C). O fago lambda apresentou grande sensibilidade, sofrendo redução na infectividade $>8 \log^1$ após 120 minutos de exposição a 300 MPa, enquanto que os fagos T4 e o ϕ X demonstraram estabilidade à pressão, indicando uma certa resistência a este agente evidenciada pela presença de partículas ainda infectivas após 24 h de exposição a 300 MPa, a temperatura ambiente. O vírus Sindbis (SINV- *Alphavirus*, família *Togaviridae*), também apresentou alta resistência à pressão, não tendo sido totalmente

¹ log = o termo será utilizado neste trabalho referente a um ciclo logarítimo, ou seja uma potência de 10

inativado após exposição a alta pressão na faixa de 300 a 700 MPa (BUTS et al., 1992 apud FDA CFSAN 2000).

O vírus da estomatite vesicular (VSV) é um vírus animal, com envoltório lipoprotéico, que apresentou alta resistência quando exposto à pressão isoladamente. A incubação por 12 horas, a 250 MPa foi necessária para reduzir a infectividade do vírus em 5 log. Estudos de microscopia eletrônica revelaram que o envoltório viral sofreu alterações apresentando algumas projeções na superfície, mas se manteve parcialmente íntegro (SILVA et al., 1992).

DaPOIAN et al, (1993) demonstraram que o bacteriófago R17 se mostrou altamente resistente à pressão sofrendo apenas 10% de dissociação da partícula inteira quando pressurizado por 8 horas a 250 MPa. Quando combinado com uréia em concentrações de 1 a 5 M a pressão promoveu dissociação completa, porém reversível do vírus.

BONAFÉ et al., (1998) pressurizando a 250 MPa suspensões de TMV somente observaram dissociação e desnaturação da partícula quando combinaram o efeito da pressão à uréia em concentração de 2,5 M. Partículas virais apresentam alto grau de diversidade estrutural e isto deve representar um alto grau de variação na resistência à alta pressão hidrostática.

JURKIEWICZ et al., (1995) estudaram a possibilidade de se utilizar amostras do vírus da imunodeficiência simia SIV (retrovírus contendo envoltório) inativadas com HHP como alternativa na produção de vacinas. Observaram que foi necessária 1 hora de exposição a 250 MPa, 3 horas a 200 MPa e mais que 8 horas a 150 MPa para reduzir em no mínimo 5 log a população infectiva inicial das suspensões virais.

A infectividade do vírus do herpes simples humano do tipo 1 (HSV-1) e do citomegalovírus humano (HCMV) foi drasticamente inibida pela pressão, conforme relatam NAKAGAMI et al., (1992). As suspensões virais foram expostas por 10 minutos à pressões entre 0,1 a 600 MPa. Os títulos iniciais das suspensões virais eram diferentes, mas as amostras foram totalmente inativadas quando expostas a pressões maiores que 300 MPa, sendo que o maior padrão de inativação foi observado a 400 MPa, atingindo >7 log de redução na infectividade do HSV e 4 log no HCMV.

PONTES et al., (1997) e PONTES da SILVA, (1999) relataram que enquanto a exposição do rotavírus símio (vírus sem envoltório lipoprotéico) a 150 MPa não inativou a partícula, a incubação das amostras a 250 MPa por 20 e por 60 minutos reduziu a infectividade viral em 4 e 6 log respectivamente. Para o rotavírus bovino a exposição a 250 MPa por 30 e por 60 minutos conduziu a inativação da suspensão viral em 4 e 5 log da população infectiva inicial respectivamente.

OLIVEIRA et al., (1997) estudando membros da família *Picornaviridae* relataram que para o vírus da febre aftosa (FMDV) a exposição à pressão de 250 MPa por 60 minutos acarretou em redução da infectividade da amostra viral em 4 log. As partículas de poliovírus e rinovírus não sofreram alteração na infectividade quando expostas a 240 MPa, tendo sido necessário abaixamento da temperatura até -15°C e aplicação de uréia em concentrações sub-desnaturantes (1,0 a 2,0 M) para se observar dissociação dos vírus.

Os vírus Mayaro e Sindbis (*Alphavirus*, família *Togaviridae*) foram estudados por GASPAR, (2000). Foi observado que a pressurização das amostras à 250MPa por 8 horas promoveu queda na infectividade em 7 log e 5 log para as duas amostras respectivamente quando em concentração inicial 10^9 PFU/mL. A não inativação total dos vírus foi observada tanto para amostras purificadas quanto para parcialmente purificadas, indicando que o meio de suspensão da partícula não interferiu na cinética de inativação.

TIAN et al., (2000) estudaram o efeito da HHP em amostras do IBDV e observaram que a partícula viral apresenta alta sensibilidade à pressão, sendo a inativação da ordem de >5 log obtida em suspensões virais após exposição na faixa de 60 a 140MPa.

2.3.2 Efeito da alta pressão hidrostática sobre a imunogenicidade de partículas virais

A idéia se de utilizar a pressão hidrostática para inativação viral surgiu da observação de efeitos comparáveis sobre proteínas de diversas subunidades e conseqüentemente da possibilidade da preservação das propriedades imunogênicas das partículas (SILVA & WEBER., 1988, SILVA et al., 1992). Em muitos casos a imunização efetiva contra vírus

requer fornecimento da partícula inteira ao sistema imune (NORRBY, 1987 apud SILVA 1992). Esta exigência acoplada à necessidade da eliminação da infectividade limita enormemente as possibilidades de preparação de vacinas apropriadas (SILVA et al., 1992).

Os efeitos biologicamente importantes da pressão hidrostática até 300 MPa já observados incluem a dissociação de proteínas oligoméricas com perda parcial da afinidade das unidades (SILVA & WEBER, 1993), a dissociação reversível de vírus icosaédricos (SILVA & WEBER, 1988) e decréscimo da fluidez de vesículas com camadas duplas e de membranas das células (CHONG & WEBER, 1983). Somente pressões substancialmente altas é que apresentam efeito de importância sobre proteínas monoméricas (WEBER, 1992).

SILVA et al., (1992) observaram que preparações purificadas, bem como parcialmente purificadas de VSV, quando pressurizadas a 250 MPa sofreram queda na infectividade com manutenção do poder imunogênico. Quando observadas ao microscópio eletrônico, as preparações tratadas com pressão apresentaram alterações na superfície das membranas na forma de protuberâncias. A redução na fluidez lipídica de membranas biológicas pressurizadas, provavelmente favoreceria tanto extrusão a partir da membrana, quanto mudanças na associação das proteínas integrantes da membrana. Porém, apesar destas alterações, os sítios antigênicos das partículas foram mantidos intactos e funcionais após despressurização. O mesmo padrão de alteração morfológica foi observado, através de estudos de microscopia eletrônica, para o FMDV (OLIVEIRA et al., 1997); para os rotavírus bovino e símio (PONTES, 1991 e PONTES da SILVA 1997); e para o IBDV (TIAN et al., 2000). A manutenção da imunogenicidade do FMDV e IBDV também foi observada pelos autores citados após inoculação das amostras pressurizadas em coelhos e detecção de anticorpos neutralizantes nos soros.

GASPAR (2000) observou através de estudos de microscopia eletrônica do vírus Mayaro, que após exposição da suspensão viral por 8 horas a 250 MPa, foram visualizadas alterações morfológicas no envoltório, mas as espículas das glicoproteínas foram observadas intactas. Tais alterações não alteraram a funcionalidade imunológica da partícula viral, que, quando inoculadas em coelhos, gerou o mesmo padrão de resposta imune que a partícula nativa não pressurizada.

3 OBJETIVOS

3.1 *Objetivo geral*

Estudar o efeito da pressão hidrostática sobre o PVA, vírus causador da Síndrome da Cabeça Inchada em galinhas, como metodologia alternativa para a produção de suspensão viral inativada.

3.2 *Objetivos específicos*

- Estudar *in vitro* o efeito dos parâmetros pressão e tempo de incubação na redução da infectividade do PVA. Através do estudo da cinética de inativação sob pressão padronizar uma suspensão de PVA inativada por este agente físico.
- Determinar *in vitro* a cinética de inativação do PVA por meio da betapropiolactona para obtenção de suspensão padronizada inativada totalmente e parcialmente por este agente químico.
- Estudar *in vitro* o efeito inativante da betapropiolactona combinada com alta pressão hidrostática sobre a infectividade do PVA.
- Estudar em condição de biotério, através de reação de soroneutralização, a resposta imune em galinhas de 21 dias de idade após imunização com preparação de PVA inativada por meio de alta pressão hidrostática, seguindo os parâmetros previamente padronizados nos estudos realizados *in vitro*. Avaliar o padrão de soroconversão em relação ao obtido em aves inoculadas com amostra de PVA virulenta.

- Estudar em condição de biotério, através de reação de soroneutralização, a resposta imune de galinhas de 21 dias de idade após imunização com suspensão de PVA inativada com BPL .
- Estudar em condição de biotério, através de reação de soroneutralização, a resposta imune de galinhas de 21 dias de idade após imunização com suspensão de PVA inativada pela combinação de BPL e exposição à alta pressão hidrostática.
- Avaliar em condições de campo e através dos testes de soroneutralização e ELISA, o padrão de resposta imune em galinhas de 51 dias de idade imunizadas com amostra padronizada de PVA inativada por meio de alta pressão hidrostática e desafiadas com amostra de PVA virulenta.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 *Métodos gerais para células e vírus*

4.1.1 Amostras virais

A estirpe de PVA utilizada, SHS-119-BR, foi isolada no Brasil por ARNS & HAFEZ, (1995) de galinhas matrizes com SCI, adaptada em cultura de anel de traquéia seguida de 18 passagens em células CER (chicken embryo related).

4.1.2 Células

Foi utilizada uma linhagem contínua de célula CER, doada ao Laboratório de Virologia do IB-UNICAMP pelo Prof. Dr. H. M. HAFEZ (Freie Universität Berlin, Alemanha). A célula CER é resultado da mistura de célula primária de embrião de galinha com célula de rim de Hamster (SMITH et al., 1977).

As células foram cultivadas em garrafas de 75 cm² (Corning®) com concentração inicial de 5 x 10⁵ células/mL em meio mínimo essencial de Eagle (MMEE, Cultilab) com 10% de soro fetal bovino (SFB, Sigma) por 48 horas a 37°C.

4.1.3 Produção de antígeno

A amostra viral foi propagada em monocamadas de células CER jovens (24 horas), apresentando crescimento uniforme. O meio de crescimento celular foi infectado com 100

DICT₅₀/mL da amostra viral e após uma hora de adsorção a 37°C, o inóculo foi lavado e adicionado MMEE com 1% de SFB. As garrafas inoculadas foram incubadas a 37°C até observação efeito citopático característico. Os cultivos foram colhidos e titulados quando apresentavam 80-90% de efeito citopático sobre a monocamada. Em geral, a formação de sincício celular ocorreu após 3 a 4 dias de incubação. As amostras produzidas foram estocadas à -70°C.

4.1.4 Titulação das amostras virais

As amostras virais foram tituladas em placas de poliestireno com 96 orifícios (Corning®). Cada cavidade foi preenchida com 50 µL de amostra viral após diluição serial em base 10, em oito repetições e com 50 µL de MMEE acrescido de 2% de SFB. Em seguida foram adicionados 100 µL de células CER em concentração de 5×10^5 células/mL. As placas foram incubadas em estufa de atmosfera úmida de 5% de CO₂ a 37°C durante 5 dias até o aparecimento de efeito citopático típico. O DICT₅₀/mL foi calculado pelo método de REED & MUENCH (1938).

4.2 *Efeito in vitro da alta pressão hidrostática sobre o PVA*

4.2.1 Equipamento para aplicação de pressão hidrostática

Foi empregado um sistema de alta pressão que consiste de uma câmara aço (liga especial) contendo três janelas ópticas de quartzo. Um esquema de todo o sistema de

pressão hidrostática foi ilustrado na Figura 2, e um esquema do interior da câmara pode ser visto na Figura 3.

A pressão é gerada por um sistema de pistão que injeta o etanol através de dutos metálicos até a câmara. O pistão é operado manualmente e a pressão é monitorada por um manômetro analógico acoplado ao sistema (PALADINI, A.A. & WEBER, G., 1981).

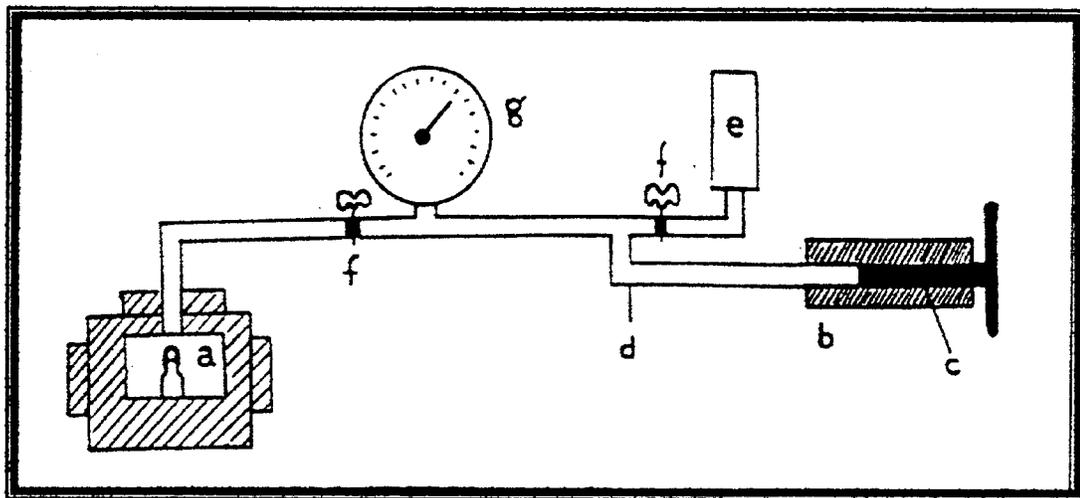


Figura 2. Esquema geral do sistema de pressão hidrostática utilizada no trabalho. Câmara de pressão (a), conectada ao gerador de pressão (b), com o pistão (c) que comprime a linha de etanol (d). Reservatório de etanol (e), válvulas (f) e manômetro (g) (Fonte: SUAREZ, 1995).

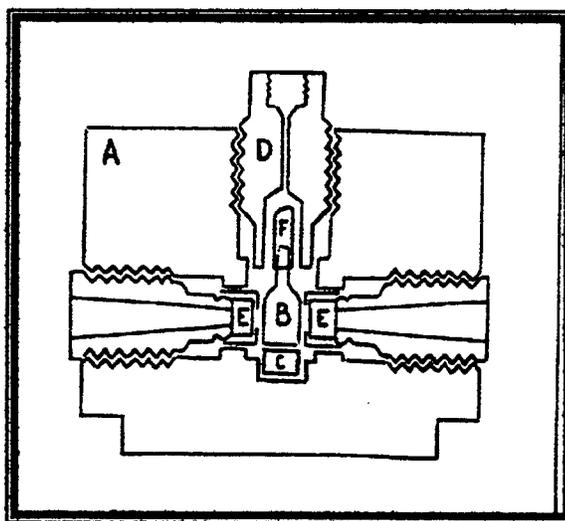


Figura 3. Esquema da câmara de pressão em corte lateral. Câmara de pressão (A), com a cubeta (B) e seu suporte metálico (C). O sistema gerador de pressão é conectado à câmara por um anel metálico (D) pela parte superior. As janelas de quartzo (E) permitem o acompanhamento da pressurização das amostras por medidas de fluorescência e espectroscopia de absorção. Um tubo de polietileno (F) sela o material contido na interior da cubeta e permite a equalização da pressão interna com a externa (Fonte: SUAREZ, 1995).

4.2.2 Efeito do aumento da pressão hidrostática na redução da infectividade do PVA

Em câmara de fluxo laminar, 2 mL da amostra viral foi colocado em cubeta de quartzo estéril. As cubetas foram fechadas com um tubo de polietileno estéril selado com calor em uma das extremidades. Somente uma cubeta pode ser pressurizada por vez, portanto, cada cubeta foi preparada no momento do uso e imediatamente instalada no equipamento de alta pressão para incubação pelo tempo e pressão de estudo. As amostras

de PVA, previamente tituladas, foram expostas às pressões de 50, 100, 150, 200, 250, 280 e 300 MPa aplicadas pelo tempo fixo de 60 minutos. Após exposição à alta pressão, as amostras foram trazidas à pressão atmosférica e em seguida encaminhadas para titulação. Uma amostra viral não exposta à pressão foi utilizada como controle. O título da amostra controle foi utilizado como número inicial de partículas virais por amostra em contraposição aos títulos das amostras pressurizadas. O ensaio foi realizado com uma repetição e cada pressão foi estudada em duplicata.

4.2.3 Efeito do tempo de exposição a 250 MPa na redução da infectividade do PVA

As amostras virais foram expostas à pressão fixa de 250 MPa por 8 diferentes tempos de estudo: 20, 30, 60, 80, 90, 100, 120 e 150 minutos à temperatura ambiente. Para cada tempo de estudo uma cubeta foi preparada no momento do ensaio. Após exposição à pressão pelos tempos de estudo, a amostra viral foi trazida à pressão atmosférica e titulada para determinação do efeito inativante. Cada tempo foi estudado em duplicata. O ensaio foi realizado com uma repetição.

Para confirmação de ausência total de replicação da suspensão, as amostras que apresentaram ausência de título viral foram encaminhadas para cultivos sucessivos em monocamadas de células CER (conforme metodologia descrita em 4.1.3). Foram consideradas totalmente inativadas as amostras que apresentaram ausência de efeito citopático após 3 cultivos sucessivos.

4.3 Efeito in vitro da Betapropiolactona (BPL) sobre o PVA

4.3.1 Efeito da concentração de BPL na redução da infectividade do PVA

A solução concentrada de betapropiolactona (BPL, Sigma) foi mantida em refrigeração protegida da luz até o momento do uso (LOMBARDINI, 1997). A partir de uma solução concentrada de BPL foram preparadas suspensões de PVA inativadas nas concentrações finais de 0,2%, 0,1%, 0,05%, 0,025% e 0,02%. Após adição das diferentes concentrações de BPL para obtenção da concentração final ideal de uso, o agente químico foi deixado agir sobre a amostra viral por 120 minutos sob agitação constante a 37°C. Terminado este tempo a amostra foi colocada em geladeira por 24 horas para interrupção da ação da BPL. Após exposição ao agente químico foi determinado o título viral das amostras.

4.3.2 Efeito da BPL combinada com alta pressão hidrostática na redução da infectividade do PVA

Foi estudada a potencialização do efeito inativante da BPL sobre o PVA através da exposição da amostra quimicamente inativada por dois diferentes tempos de estudo a 250 MPa. Uma amostra de PVA preparada em concentração final de BPL 0,025% foi colocada em cubeta de quartzo, fechada e exposta à pressão de 250 MPa por 30 e 20 minutos. Terminado o tempo de exposição de estudo, voltou-se à pressão atmosférica e as amostras foram tituladas. Uma amostra controle (BPL 0,025%) não exposta à pressão foi também titulada. O ensaio foi realizado com uma repetição.

4.4 Efeito da alta pressão hidrostática na imunogenicidade do PVA. Estudos in vivo

Em todos estudos *in vivo* foram utilizadas galinhas SPF Leghorn, brancas, originárias da Granja Resende (Uberlândia, MG).

4.4.1 Determinação da resposta imune em aves inoculadas com amostras de PVA inativadas com alta pressão hidrostática

Galinhas SPF de 21 dias de idade foram inoculadas com suspensão de PVA SHS119-BR inativada por pressão hidrostática (padronizada nos ensaios *in vitro* com 120 minutos de exposição a 250 MPa), com e sem adição de adjuvante. O efeito da pressão na imunogenicidade da partícula viral foi estudado observando-se o título de anticorpos soroneutralizantes gerado nas aves após administração da amostra viral fisicamente inativada. Foram utilizadas 40 galinhas SPF de duas semanas de idade, que foram divididas em quatro grupos (cinco aves por gaiola). O período de aclimação de uma semana foi aguardado para todo o lote de aves antes do início dos experimentos. Para determinação do título de anticorpos soroneutralizantes contra o PVA pré e pós-imune amostra de sangue foi colhida de todas as aves em dois períodos: imediatamente antes do início do experimento e 30 dias após o início do experimento respectivamente. A amostra de sangue foi colhida (3 mL) da veia braquial da asa. Até o final do ensaio as aves foram diariamente examinadas e acompanhadas para observação de qualquer anormalidade.

No **Grupo 1**, 10 aves foram inoculadas com a amostra de PVA, em suspensão em MMEE, inativada com pressão (120 minutos de exposição a 250 Mpa). Foram utilizadas duas vias de inoculação: 0,5 mL foi administrado via subcutânea (s.c.) no pescoço e 0,5 mL

via intramuscular (i.m.) na coxa. Uma dose reforço de igual volume e via de administração foi aplicada 15 dias após a primeira inoculação.

No **Grupo 2**, 10 aves foram inoculadas com a amostra de PVA inativada com pressão (120 minutos de exposição a 250 MPa) diluída em adjuvante emulsão óleo mineral (MOE). O volume de 1,0 mL da suspensão inativada foi dividido em 0,5 mL administrado via s.c. no pescoço e 0,5 mL via i.m. na coxa. Uma dose reforço de igual volume e via de administração foi aplicada 15 dias após a primeira inoculação.

No **Grupo 3**, 10 aves foram inoculadas com a amostra de PVA sem tratamento na concentração de $10^{6,5}$ DITC₅₀/mL. A suspensão viral em MMEE foi administrada por gotejamento via nasal e intraocular (0,5 mL em cada via). Uma dose reforço de igual concentração, volume (1 mL) e rota de administração foi aplicada 15 dias após a primeira dose.

No **Grupo 4**, 10 aves foram utilizadas como controle negativo, as quais não receberam nenhum tipo de amostra viral, porém foram mantidas com o mesmo esquema de alimentação e cuidados que as aves dos outros 3 grupos de tratamentos.

4.4.2 Teste de soroneutralização

Para determinação do título de anticorpos soroneutralizantes nas aves foi utilizado o Método β . Concentrações constantes de vírus foram colocadas frente a diluições seriadas dos soros a serem testados. O teste de soroneutralização foi realizado segundo COLLINS et al., (1993) com algumas modificações. Os soros foram inativados a 56°C por 30 minutos em banho-maria. Em placas de poliestireno de 96 cavidades (Corning®) foram adicionados

50 µl de MMEE contendo 5% de antibióticos (penicilina 5×10^6 UI; estreptomicina 5 g e fungizona 5 g). Em seguida foram acrescentados 50 µl das amostras de soro a serem testadas, e feita uma diluição seriada em base 2 a partir da primeira coluna da placa (da esquerda para direita, de 1:2 até 1: 1024). Terminado o procedimento de diluição dos soros, foi colocado em cada orifício o volume de 50 µl da amostra viral contendo 100 DICT₅₀/mL. A mistura soro-vírus foi incubada durante 1 hora a 37°C. Após este período foi adicionada 100 µl de célula CER (5×10^5 /mL) a cada cavidade. As placas foram incubadas por 5 dias em estufa de atmosfera úmida de CO₂, e foi observado o aparecimento de efeito citopático.

Controles de soro – positivo e negativo para o PVA (produzidos e padronizados no laboratório de Virologia Animal do DMI/IB UNICAMP) também foram preparados nos mesmos padrões que as amostras estudadas. Controle de célula foi feito em todas placas.

Os títulos soroneutralizantes (SN) de cada soro foram expressos neste trabalho como o log₂ da recíproca da diluição mais alta resultante em 100% de neutralização do efeito citopático do PVA (ETERRADOSSI et al., 1995; SANTOS & SILVA, 2000). Títulos soroneutralizantes iguais ou menores que 1:4 foram considerados negativos (HAFEZ, 1990; ETERRADOSSI et al., 1995).

Os títulos soroneutralizantes médios de cada grupo foram comparados para diferença estatística pelo do teste de Student-Newman-Keuls, utilizando-se o recurso GLM do software de análise de dados Statistical Analysis System (general linear model procedure dentro do SAS).

4.5 Efeito da betapropiolactona na imunogenicidade do PVA

4.5.1 Determinação da resposta imune de aves SPF inoculadas com amostras de PVA inativadas com BPL e de aves inoculadas com amostras de PVA inativadas com a combinação de BPL e exposição à alta pressão hidrostática

Neste ensaio, duas variáveis foram estudadas quanto ao efeito na manutenção da imunogenicidade do PVA: o padrão de resposta imune gerado em aves inoculadas com amostra de PVA inativada pela exposição a betapropiolactona 0,1%, e o efeito da combinação da inativação viral por alta pressão hidrostática com a exposição à BPL 0,025%.

Para simular as condições de preparo, estocagem e administração das amostras virais inativadas com este agente, e comercialmente disponíveis para imunização de animais contra outros vírus, as amostras de PVA foram diluídas em adjuvante MOE. Foi utilizada a suspensão padronizadas na fase de estudos *in vitro* que apresentou efeito inativante.

O mesmo desenho experimental do estudo descrito em 4.4.1. foi seguido neste ensaio.

Foram utilizadas 30 aves SPF de 15 dias, que foram dispostas em grupos de cinco em gaiolas, e deixadas aclimatar por uma semana. As aves foram divididas em três grupos de 10 aves cada um. Quando as aves atingiram 21 dias de idade foi dado início ao experimento. Uma amostra de sangue (3 mL) obtida através da veia braquial da asa, foi colhida de todas as aves pertencentes aos 3 grupos de estudo antes da administração das amostras virais inativadas e 30 dias após esta data. O soro das aves foi utilizado na determinação do título de anticorpos soroneutralizantes pré e pós imune (conforme descrito em 4.4.1). Os títulos soroneutralizantes médios de cada grupo também foram comparados para diferença estatística pelo teste de Student-Newman-Keuls (utilizando-se procedimento GLM do SAS).

No **Grupo 1**, as aves receberam 1,0 mL de amostra de PVA inativada com BPL (0,1%) e diluída em MOE. Foram utilizadas duas vias de inoculação: 0,5 mL foi administrado via s.c. no pescoço e 0,5 mL via i.m. na coxa. Uma dose reforço de igual volume e via de administração foi aplicada 15 dias após a primeira inoculação.

No **Grupo 2**, 10 aves foram inoculadas com suspensão de PVA inativada pela exposição combinada de BPL a 0,025% com 30 minutos de exposição a 250 MPa. Desta suspensão inativada e diluída em MOE, 1,0 mL foi administrado em cada ave sendo 0,5 mL via s.c no pescoço e 0,5 mL via i.m. na coxa. Uma dose reforço de igual volume e via de administração foi aplicada 15 dias após a primeira inoculação.

No **Grupo 3**, grupo controle negativo, as aves não foram inoculadas com nenhum tipo de amostra viral.

As aves foram diariamente examinadas e acompanhadas para observação de qualquer anormalidade.

4.6 Efeito da alta pressão hidrostática na imunogenicidade do PVA. Estudo de campo. Desafio com amostra de PVA virulenta (SHS-119-BR)

Neste estudo foram utilizadas 60 galinhas SPF de cinco semanas de idade, mantidas em gaiolas durante todo o experimento. As aves foram deixadas em aclimatação por uma semana. Foram formados 3 grupos contendo 30 aves no primeiro e 15 aves no segundo e no terceiro grupo

As aves foram imunizadas com amostra de PVA inativada sob pressão (120 minutos a 250 MPa) e posteriormente desafiadas com amostra de PVA selvagem. O título de anticorpos foi determinado pelos métodos de ELISA e soroneutralização durante todo o experimento (seis meses) para acompanhar o perfil de resposta imune nas aves e a manutenção da soropositividade das mesmas até a fase de postura. Para simular condições de campo, as gaiolas foram acondicionadas em uma sala previamente limpa, desinfetada e com iluminação e ventilação natural. Uma coleta de sangue foi feita (3 mL pela veia braquial da asa) em todas as aves quando estas estavam com 6, 8, 10, 12,14,17, 21 e 23 semanas de idade. Os soros foram utilizados para determinação dos títulos de anticorpos. Os títulos de anticorpos médios de cada grupo também foram comparados para diferença estatística pelo do teste de Student-Newman-Keuls (utilizando-se procedimento GLM do SAS).

No **Grupo 1**, 30 aves foram inoculadas com 1,0 mL de suspensão de PVA inativada pela pressão (padronizada nos experimentos *in vitro* 120 minutos de exposição a 250 MPa). A amostra foi administrada 0,5 mL via s.c. no pescoço e 0,5 mL i.m. na coxa das aves. Uma dose reforço foi aplicada no mesmo esquema 15 dias após a primeira inoculação. Ao completar 10 semanas de idade (30 dias após a primeira inoculação) as aves foram submetidas a desafio com 1,0 mL de suspensão PVA selvagem (SHS 119-BR, $10^{6,5}$ DICT₅₀/mL) aplicada via gotejamento nasal e ocular.

No **Grupo 2**, 15 aves receberam somente o desafio com PVA selvagem na mesma data, dose e via de administração que as aves do Grupo 1 quando completaram 10 semanas de idade.

No **Grupo 3**, 15 aves foram utilizadas como controle negativo, não tendo recebido nenhum tipo de amostra viral durante todo o experimento.

As aves do grupo controle negativo (grupo 3) foram mantidas em sala diferente dos grupos 1 e 2 para evitar contato com o vírus provavelmente carregado pelo operador durante procedimentos de aplicação de imunógeno, limpeza e alimentação das aves e acompanhamento da saúde dos animais. Todas as aves foram regularmente examinadas e acompanhadas para observação de qualquer anormalidade.

4.6.1 Teste de ELISA.

Foi utilizado um “kit” comercial de ELISA para galinhas, FLOCKSCREEN™ TRT, Guildhay Ltd, Inglaterra. As amostras de soro foram previamente diluídas em concentração de 1:500 em tampão fosfato contendo proteína estabilizadora e azida sódica a 0,2%. Um volume de 50 µL de amostra foi adicionado às placas de 96 orifícios, juntamente com controles negativo e positivo em duplicata. As placas assim preparadas foram cobertas e incubadas por 60 minutos a 37°C. Após quatro lavagens com 300µL por cavidade a solução de lavagem (tampão fosfato contendo azida sódica a 2%), foram adicionados 50 µL do conjugado (IgG de asno anti-galinha conjugada à fosfatase alcalina) em cada cavidade. Após incubação por 60 minutos a 37°C e lavagem idêntica à anterior, foi adicionado o volume de 50 µL/cavidade do substrato da enzima (tampão contendo dietanolamina, fenoltaleína monofosfato e co-fatores enzimáticos). As placas assim preparadas foram incubadas novamente por 30 minutos a 37°C sendo que em seguida foi inibida a reação enzimática pela adição da solução de interrupção (“stop”) quando se evidenciou a coloração rosa clara. A leitura das placas foi feita em espectrofotômetro a 550 nm (Microtitre plate reader).

A leitura e classificação dos resultados foram feitas de acordo com instruções do fabricante. Os resultados foram apresentados como \log_2 do título de anticorpos correspondente à leitura de densidade ótica.

5 RESULTADOS

5.1 *Produção e titulação viral*

Os títulos médios obtidos para os estoques de amostra viral da estirpe de PVA SHS-119-BR foram da ordem de $10^{6,5}$ a $10^{6,8}$ DICT₅₀/mL.

5.2 *Efeito in vitro da alta pressão hidrostática sobre as amostras de PVA*

5.2.1 Efeito do aumento da alta pressão hidrostática na redução da infectividade do PVA

Foi observado que com o aumento da pressão houve aumento na redução da infectividade das amostras de PVA. Após exposição por tempo fixo de 60 minutos, na faixa de 0 a 150 MPa, houve redução $<1,0$ log no título viral das amostras, porém na faixa de 200 a 250 MPa houve queda franca de infectividade da ordem de $1,0$ log a cada 50 MPa. Observa-se na Figura 4 que de 250 a 300 MPa houve um padrão mais suave de perda da infectividade do vírus. A pressão de 250 MPa foi àquela escolhida para ser utilizada neste trabalho.

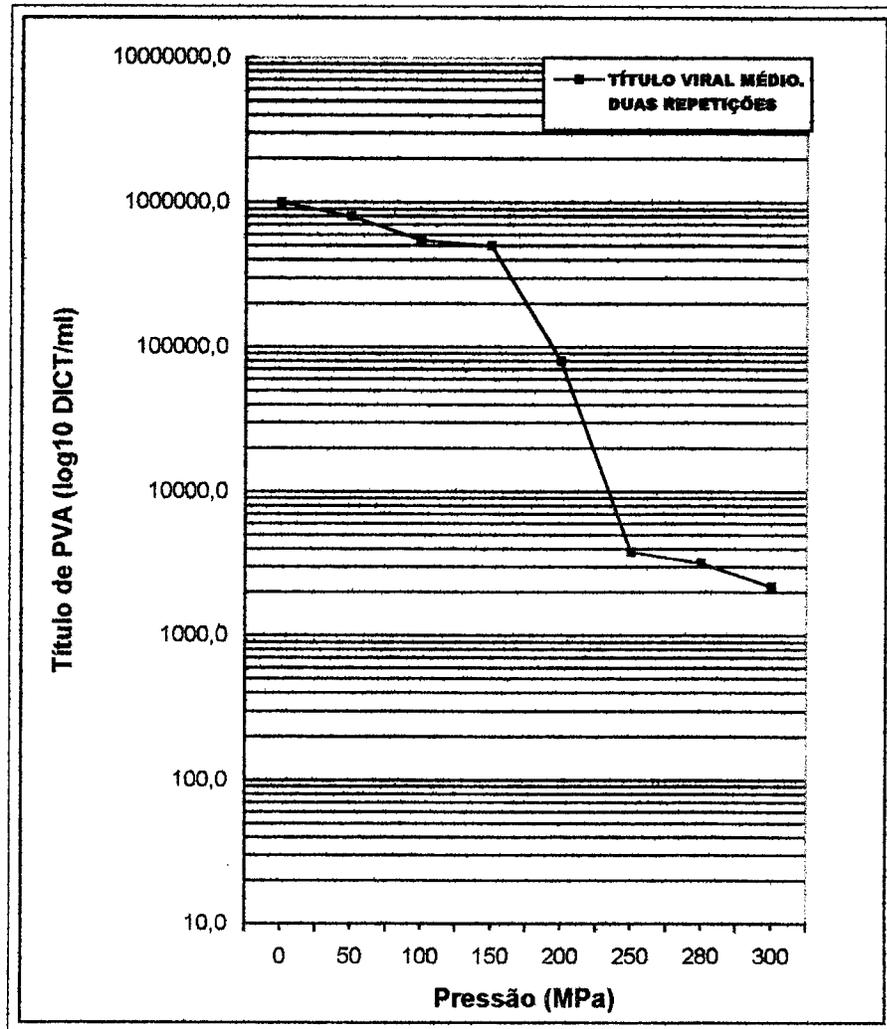


Figura 4. Efeito da pressão hidrostática sobre suspensões de PVA. Decréscimo do título viral com o aumento da pressão. Suspensões expostas por 60 minutos às pressões de : 50, 100, 150, 200, 250, 280 e 300 MPa. Títulos virais médios para duas repetições dos ensaios.

5.2.2 Efeito do tempo de exposição a 250 MPa na redução da infectividade do PVA

Os resultados obtidos mostraram a ocorrência de replicação viral após exposição da suspensão de PVA (em concentração inicial de $10^{6,8}$ DICT/mL) na faixa de 20 até 100

minutos a 250 MPa. A partir de 120 minutos inclusive, houve inativação total da partícula de PVA, tendo sido este resultado confirmado com ausência de replicação viral após três cultivos sucessivos destas suspensões em monocamadas de células CER.

Na Tabela 1 foram apresentados os títulos virais obtidos após exposição das amostras de PVA a 250 MPa por diferentes tempos.

Foi observado decréscimo médio de 2 log no título viral quando as amostras foram expostas a 250 MPa por 30 minutos, sendo que houve queda na infectividade da ordem de 3,5 a 4 log após 60 minutos de exposição, e > 5 log após 100 minutos.

Tabela 1. Efeito do tempo de incubação a 250 MPa sobre o PVA.
Aumento do tempo de exposição à pressão e queda no título viral.

Tempo de incubação a 250Mpa min.	Título viral log DICT₅₀/mL
0	6,7 (0,15)
20	6,00 (0,12)
30	4,97 (0,18)
60	3,18 (0,08)
80	1,75 (0,11)
90	1,31 (0,08)
100	0,61 (0,15)
120	srv*
150	srv

srv = sem replicação viral. Desvio padrão entre parênteses.

A Figura 5 ilustra graficamente os dados médios de redução da infectividade do PVA frente à pressurização pelos intervalos de tempo estudados, sendo que pode-se observar também a melhor reta que se ajustou a estes dados ($R^2 > 0,8$) obtida por regressão linear. Se o modelo linear descreve adequadamente a cinética de inativação do PVA à pressão, através da extrapolação desta reta seria possível saber o nível de redução da infectividade de uma determinada combinação de tempo de exposição a 250 MPa.

A perda da infectividade apresentou dependência do tempo de incubação à pressão. A amostra de PVA inativada pela pressão que seria utilizada nas etapas subseqüentes deste projeto foi padronizada a partir dos resultados obtidos nesta etapa (amostra exposta por 120 minutos a 250 MPa).

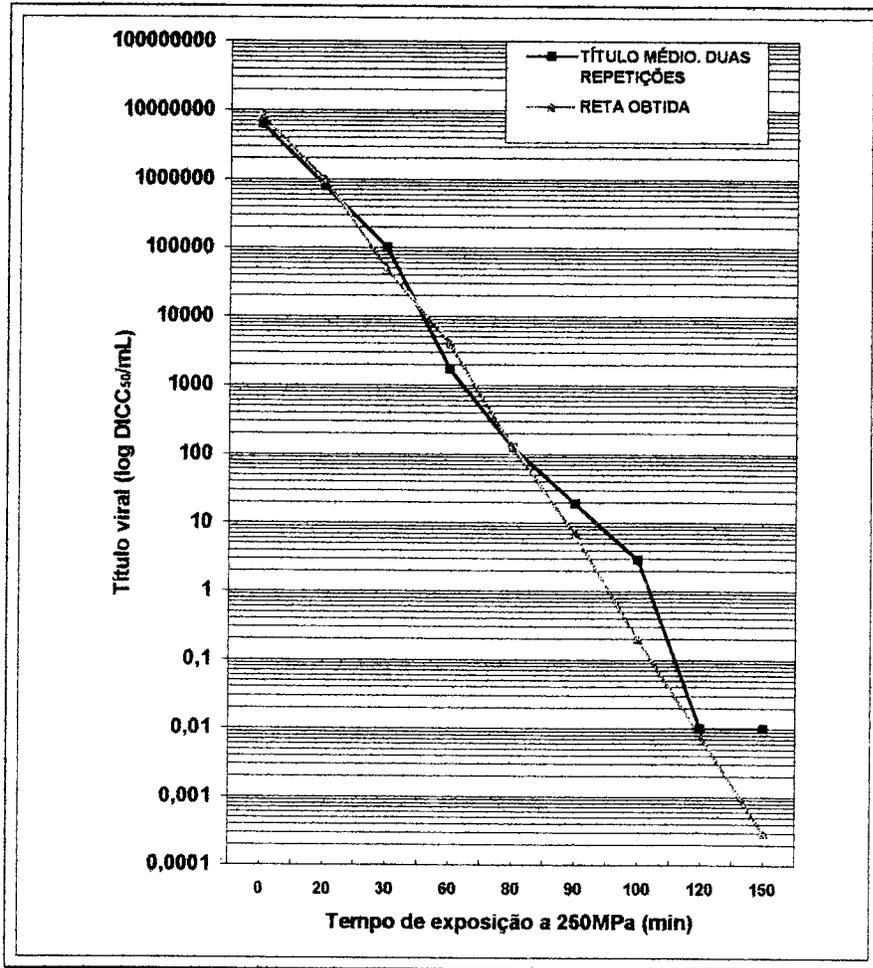


Figura 5. Efeito da alta pressão sobre o PVA. Redução da infectividade com o aumento do tempo de exposição a 250 MPa. Título viral médio de duas repetições e ilustração da linha reta que melhor se ajustou aos dados de cinética de inativação da estirpe SHS-119-BR.

5.3 *Efeito in vitro da Betapropiolactona na inativação do PVA*

5.3.1 Efeito da concentração de BPL na redução da infectividade do PVA

Após exposição das amostras de PVA à BPL nas concentrações de 0,1 ou 0,2% não houve replicação viral. Os resultados apresentados na Tabela 2 demonstram que o PVA é sensível à BPL sofrendo redução na infectividade à medida que é exposto à concentrações mais altas deste agente. Em concentrações menores que 0,05% pode ser observado efeito citopático, indicando capacidade de replicação viral e conseqüente resistência à BPL nesta concentração.

A padronização da amostra parcialmente inativada pela BPL para estudos de combinação do efeito deste agente químico com a pressão sobre o PVA foi feita com base nos resultados obtidos nesta fase.

Tabela 2. Efeito da concentração de BPL sobre o PVA. Redução da infectividade com o aumento da concentração de BPL.

Diluição da BPL %	Título viral log DICT ₅₀ /mL
Sem exposição à BPL	6,8 (0,15)
0,2	Srv
0,1	Srv
0,05	1,5 (0,15)
0,025	2,1 (0,2)
0,025*	3,3 (0,22)
0,02	3,6 (0,20)

* 60 minutos de exposição à 37°C, demais amostras 120 minutos de exposição a 37°C
srv = sem replicação viral. Desvio padrão entre parêntese.

5.3.2 Efeito da BPL combinada com pressão na redução da infectividade do PVA

Os resultados apresentados na Tabela 3 revelam ocorrência de potencialização do efeito inativante da BPL sobre o PVA após combinação com alta pressão hidrostática. A combinação da exposição a 250MPa por 20 ou 30 minutos da amostra viral parcialmente inativada com BPL (0,025%) produziu redução >5 log na população viral.

Tabela 3. Efeito da combinação da BPL 0,025% e alta pressão hidrostática (250 MPa) na inativação do PVA (SHS-119-BR) .

Concentração de BPL	Tempo de exposição a 250MPa (min)	Título viral log₁₀DICT_{50/ml}
Amostra não exposta à BPL ou pressão	0	6,8 (0,2)
0,025%	0	3,3 (0,2)
0,025%	30	srv
0,025%	20	srv

srv = sem replicação viral. Desvio padrão entre parênteses.

Na Figura 6 foram demonstrados: 1- o efeito isolado do aumento do tempo de exposição à pressão na redução da infectividade do PVA, 2- o efeito isolado da BPL (0,025%) sobre o PVA - preparada após 60 e 120 minutos de contato com a suspensão viral, e 3- o efeito da potencialização da atividade da BPL sobre o PVA através da exposição da suspensão a 250 MPa por 30 minutos. Foi observada a presença de um efeito

marcante da combinação dos dois agentes sobre a infectividade do PVA, indicado pela rápida redução do título viral a níveis não detectáveis.

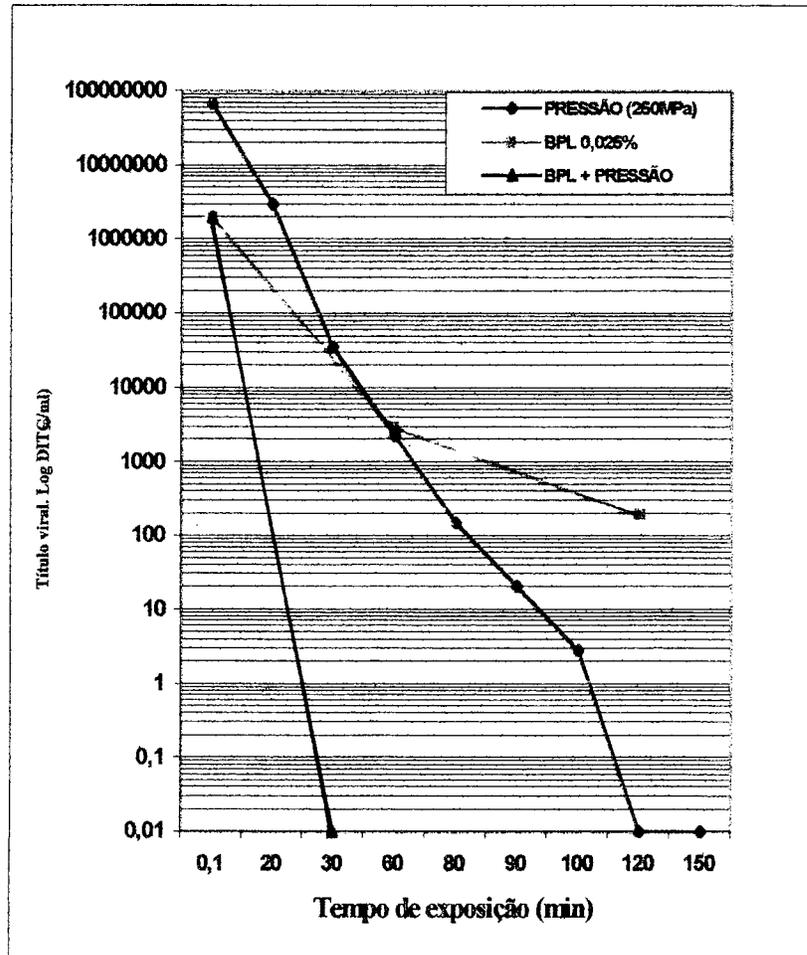


Figura 6. Efeito da exposição do PVA a três métodos de inativação na queda do título viral. Títulos virais médios de duas repetições obtidos após os tratamentos: 1) exposição à BPL 0,025% ; 2) exposição à pressão hidrostática - 250 MPa de 0 a 150 min.; 3) exposição à combinação de BPL 0,025% e 30 minutos à pressão de 250 MPa. Aumento do tempo de exposição aos agentes inativantes e redução do título viral do PVA.

5.4 Efeito in vivo da alta pressão hidrostática na imunogenicidade do PVA

5.4.1 Estudo da resposta imune em aves inoculadas com amostras de PVA inativadas com pressão

Na Tabela 4 observa-se que duas semanas após a administração das amostras virais houve produção de títulos de anticorpos da mesma grandeza nas aves inoculadas com amostras inativadas com pressão que nas aves inoculadas com amostra não inativada. Houve geração de resposta imune específica contra este vírus com título de anticorpos soroneutralizantes da ordem de 7^2 para todos tratamentos, o que denota a mesma potência das amostras.

Comparando-se o título obtido nas amostras com e sem adjuvante, foi observada uma grande similaridade, porém decidiu-se por continuar utilizando este mesmo método, para que se pudesse estabelecer correlação com o padrão de resposta imune gerado pela amostra de PVA inativada com a pressão, com o padrão gerado com a amostra de PVA inativada com BPL, uma vez que este é o procedimento de uso deste agente químico quando utilizado no preparo de vacinas veterinárias comerciais.

² Os títulos de anticorpos soroneutralizantes foram expressos neste trabalho como \log_2 da recíproca da diluição mais alta do soro capaz de neutralizar o vírus.

Tabela 4 . Títulos de anticorpos soroneutralizantes das galinhas SPF de 21 dias de idade inoculadas com amostras de PVA inativadas com pressão (120 minutos a 250 MPa - com e sem adjuvante MOE), e de aves inoculadas somente com amostra de PVA virulenta. Média dos títulos soroneutralizantes das 10 aves de cada grupo de tratamento.

Suspensão inoculada nas aves (tratamentos)	Título Soroneutralizante*
Suspensão de PVA inativada com pressão, sem adjuvante	7,6 (0,5)
Suspensão de PVA inativada com pressão, com adjuvante MOE	7,6 (1)
Suspensão de PVA selvagem	7,8 (0,6)
Aves não inoculadas – Controle negativo	negativo
Controle do teste – soro padrão positivo*	7,8 (0,3)
Controle do teste – soro padrão negativo*	negativo

Log₂ da recíproca da diluição do soro mais alta capaz de neutralizar o vírus. Desvio padrão entre parênteses.

* Controles de soro padrão (do estoque preparado e validado no laboratório de Virologia do DMI-IB-UNICAMP) para validação do teste de soroneutralização.

5.5 Efeito da Betapropiolactona na imunogenicidade do PVA

5.5.1 Determinação da resposta imune de aves SPF inoculadas com amostras inativadas com BPL e aves inoculadas com amostras inativadas com BPL e expostas à pressão.

Na Tabela 5 foram resumidos os resultados obtidos nos estudos *in vivo* do efeito da BPL isolada e combinada com a pressão na redução da infectividade do PVA.

Foi observado que 80% das aves imunizadas com amostra de PVA inativada com BPL 0,1% apresentou título SN entre 6 a 8. No entanto, as galinhas inoculadas com a amostra inativada pela combinação de BPL 0,025% e exposição à pressão apresentaram títulos soroneutralizantes mais baixos. Nesse grupo 60% das aves apresentaram títulos SN entre 6 e 8, e o restante apresentou título SN entre 4 e 5, porém foi observado o maior índice de variação entre os dados. Após análise dos dados foi observado que somente a suspensão inativada com a combinação de BPL e alta pressão produziram títulos de anticorpos soroneutralizantes estatisticamente menores do que os produzidos após inoculação das amostra de PVA inativadas somente com BPL, ou somente com alta pressão (suspensão preparada com ou sem adjuvante). As aves do grupo não inoculado com nenhum tipo de amostra viral apresentaram título SN < 3.

Tabela 5 . Títulos de anticorpos soroneutralizantes das galinhas SPF de 21 dias de idade inoculadas com amostras de PVA inativadas com BPL 0,1%, e das aves inoculadas com amostra de PVA inativada com BPL 0,025% exposta a 250 MPa por 30 minutos. Média dos títulos soroneutralizantes das aves do grupo.

Suspensão inoculada nas aves (tratamentos)	Título de anticorpos soroneutralizantes*
Suspensão de PVA inativada com BPL 0,1% , com adjuvante MOE	7,1 (0,7)
Suspensão de PVA inativada com BPL 0,025% + 30 min. 250 MPa, com adjuvante MOE	6,1 (1,4)
Aves não inoculadas – Controle negativo	negativo
Controle do teste – soro positivo padrão	7,8 (0,3)
Controle do teste – soro negativo padrão	negativo

Log₂ da recíproca da diluição mais alta do soro capaz de neutralizar o vírus. Desvio padrão entre parênteses. Controles de soro padrão (do estoque preparado e validado no laboratório de Virologia do DMI-IB-UNICAMP) para validação do teste de soroneutralização.

5.6 Efeito da pressão na imunogenicidade do PVA. Estudo de campo. Desafio com amostra de PVA virulenta

Na Tabela 6 foram apresentados os resultados dos títulos de anticorpos neutralizantes detectados nas aves do grupo 1 (aves imunizadas com amostra de PVA inativada pela pressão e desafiadas com amostra de PVA virulento) no final do experimento. Até a semana do desafio todas as aves apresentaram título soroneutralizante < ou igual a 3. Duas semanas após 33% das aves apresentaram título soroneutralizante entre 5 e 8. Quatro semanas após o desafio 60% das aves apresentaram título entre 5 e 8. A partir desta semana foi observada uma queda no título máximo desenvolvido pelas aves, sendo que até o final do experimento (7, 11 e 13 semanas após o desafio) de 57 a 67% das aves apresentaram título soroneutralizante entre 5 e 7.

Tabela 6. Título de anticorpos soroneutralizantes detectados nos soros colhidos no final do experimento - 13 semanas após desafio. Aves imunizadas com amostras de PVA inativadas com alta pressão hidrostática e desafiadas com amostra de PVA selvagem.

Suspensão inoculada nas aves (tratamentos)	Título de anticorpos soroneutralizantes*
Suspensão de PVA inativada com pressão (120 min./250MPa) – imunização, e suspensão de PVA SHS-119-BR selvagem - desafio	5,4 (0,4)
Suspensão de PVA SHS-119-BR selvagem (só desafio)	4,3 (0,24)
Aves não inoculadas com amostra de PVA	negativo
Controle do teste – soro positivo padrão	8,0 (0,2)
Controle do teste – soro negativo padrão	negativo

Log₂ da recíproca da diluição mais alta do soro capaz de neutralizar o vírus. Desvio padrão entre parênteses.

* Controles de soro padrão (do estoque preparado e validado no laboratório de Virologia do DMI-IB-UNICAMP) para validação do teste de soroneutralização.

Na Figura 7 foram apresentados os títulos mínimos e máximos de anticorpos soroneutralizantes obtidos para as aves inoculadas com amostra pressurizada e desafiadas, durante toda duração do experimento. Nessa figura, pode-se observar que após o desafio os valores máximos dos títulos de anticorpos obtidos foram da ordem de 7 a 8⁺. Foi observado que o número de aves com os títulos mais altos apresentou uma leve queda no final do experimento, mas o título máximo observado foi semelhante até o final.

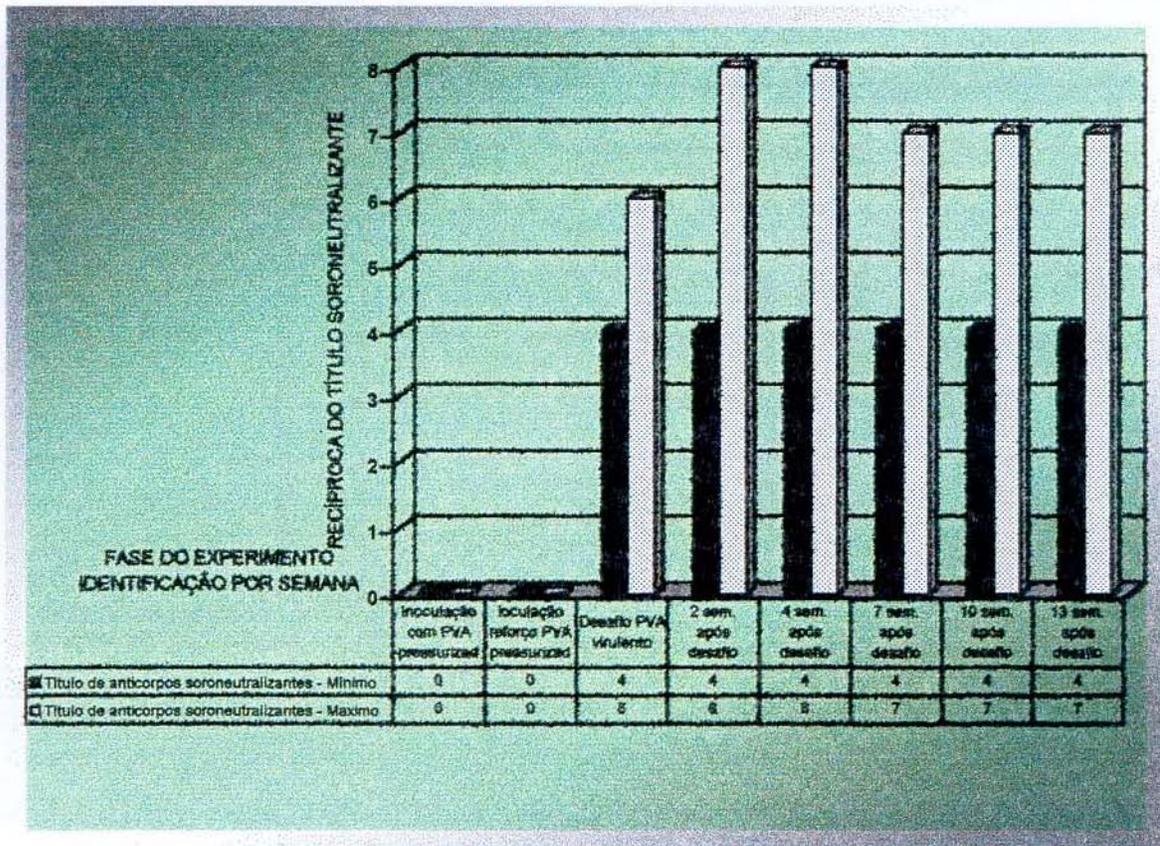


Figura 7. Título de anticorpos soroneutralizante de aves inoculadas com PVA inativado com alta pressão hidrostática (120 min. 250 MPa) e desafiadas com amostra de PVA virulenta. Aves inoculadas com 6 semanas de idade; aplicação de dose de reforço 2 semanas após; e aplicação de dose desafio com amostra de PVA selvagem 4 semanas após primeira inoculação; amostras de soro colhidas até as aves atingirem 23 semanas de idade.

A variação de títulos de anticorpos neutralizantes obtidos para o grupo controle negativo, formado pelas aves somente desafiadas ao longo de todo o ensaio foram demonstrados na Figura 8. Somente duas semanas após o desafio com PVA virulento é que as aves apresentaram soroconversão (título de anticorpos >3,0). Uma forte resposta imunológica indicada por um pico de anticorpos, foi detectada 4 semanas após o desafio. As aves se mantiveram soropositivas até o final do experimento com valores médios menores que os observados nas aves inoculadas com PVA pressurizado antes do desafio.

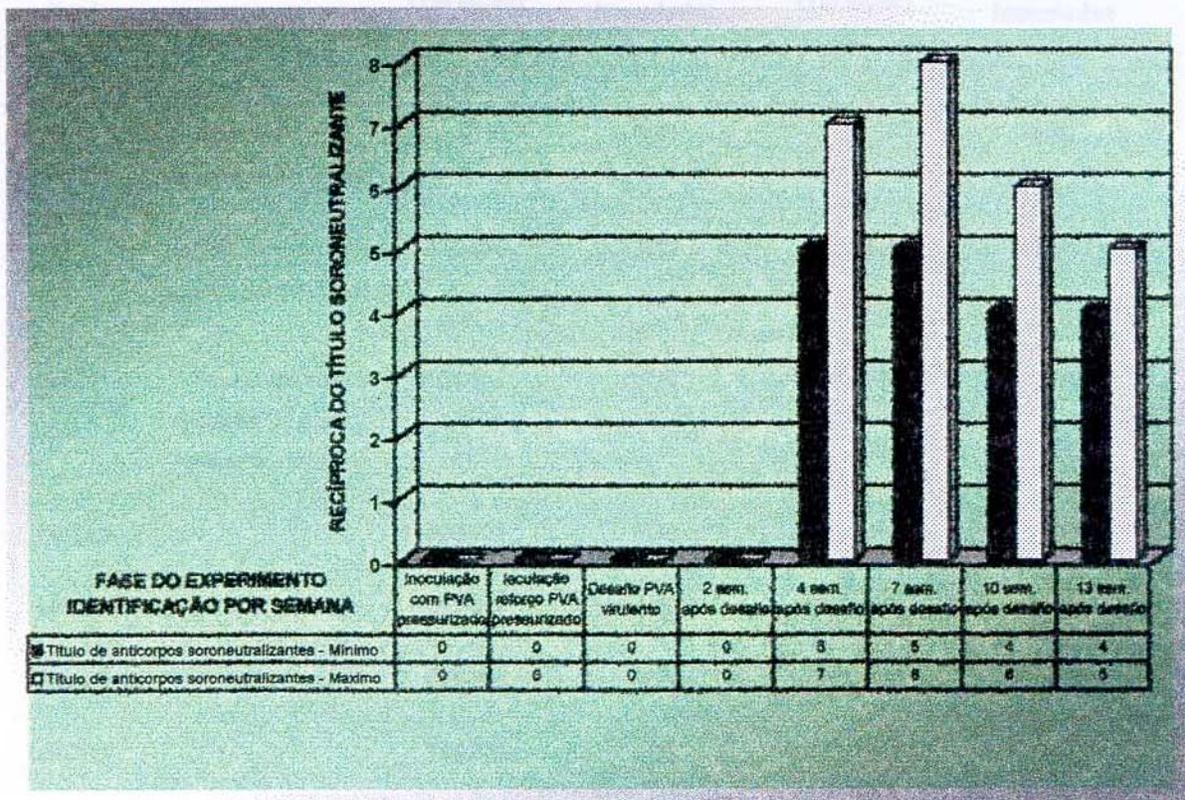


Figura 8. Título mínimo e máximo de anticorpos soroneutralizantes do grupo de aves inoculadas com amostra de PVA virulenta às 10 semanas de idade – aves controle positivo.

Tabela 7 . Título de anticorpos de aves inoculadas com amostras de PVA inativadas com alta pressão hidrostática (120 min. a 250 MPa) e desafiadas com amostra de PVA virulenta. Resultados do teste de ELISA dos soros colhidos nas fases indicadas pela idade das aves. Indicação dos títulos mínimos e máximos de anticorpos determinados para as aves.

Idade das aves em dias/ semanas	Momento da colheita de sangue	Título aves suspeitas¹ (variação)	Número de aves suspeitas / Total de aves inoculadas	Título aves positivas² (variação)	Número de aves positivas / Total de aves inoculadas
50/6,5	inoculação com amostra pressurizada	-	0/30	-	0/30
62/8	reforço da dose com amostra pressurizada	676-876	3/30	892-1109	3/30
80/10	inoculação com amostra de PVA virulenta – desafio	668-753	6/30	988-1726	12/30
100/12,5		700-772	3/30	993-4372	26/30
114/14		691-819	4/29	1002-4536	22/29
132/17		691-806	4/28	1212-2302	17/28
163/20,5		576-729	6/28	825-1901	13/28
180/23		575-791	6/27	932-1401	14/27

Na Figura 9 foram demonstrados os títulos de anticorpos obtidos para as aves do grupo controle positivo – somente desafiadas com amostras de PVA virulenta durante todo o experimento. Observou-se que o pico de título de anticorpos foi detectado 4 semanas após

aplicação do desafio, atingindo a faixa de $\log_2 10$ a $\log_2 12,4$, sendo que em seguida foi observada uma queda que se manteve até o final do estudo.

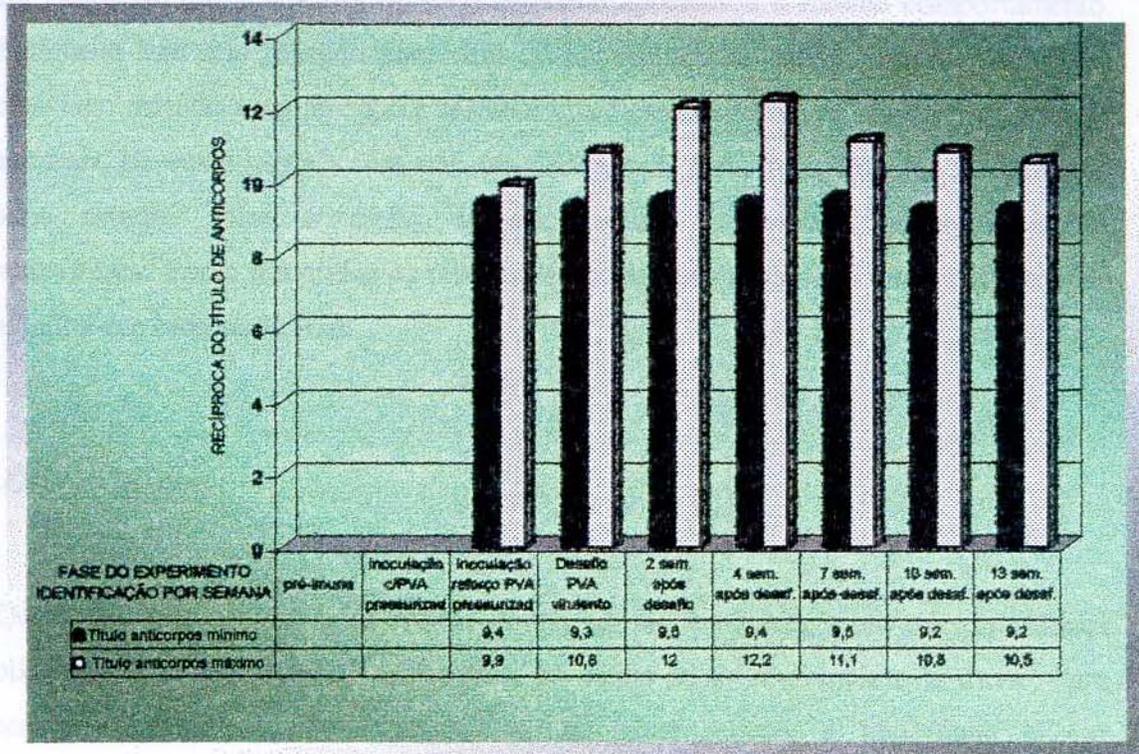


Figura 9. Título de anticorpos neutralizantes detectados por ELISA, em soros de aves inoculadas com PVA inativado com alta pressão hidrostática e desafiadas com amostra de PVA virulenta. Aves inoculadas com 6 semanas de idade; aplicação de dose de reforço com 8 semanas; aplicação de dose desafio com amostra de PVA selvagem com 10 semanas; amostras de soro colhidas até 23 semanas e idade.

6 DISCUSSÃO

Embora ainda não totalmente elucidado, sabe-se que após aplicação de ciclos de pressurização e despressurização sobre algumas partículas virais, estas sofrem algumas alterações que as tornam não infectivas porém imunogênicas. Os resultados obtidos neste trabalho indicaram que a amostra de PVA estudada apresentou o mesmo comportamento. Esse fenômeno tem sido relatado para vírus de importância na saúde humana e animal, o que torna este método uma tendência bastante atual como alternativa para a produção de vacinas virais. Diversos gêneros têm sido estudados, mas até o momento não haviam sido realizados estudos sobre o efeito da alta pressão hidrostática sobre a família *Paramyxoviridae*. Serão discutidos os resultados obtidos nos estudos *in vitro* e em seguida os resultados dos estudos *in vivo*.

6.1 Estudos *in vitro*

Os modelos de previsão dos efeitos de um agente inativante sobre microrganismos são obtidos a partir de tratamento matemático de dados de sobrevivência e de morte. Para preparar uma vacina de vírus inativado a um nível seguro, é importante chegar cuidadosamente a um modelo que melhor descreva a cinética da perda da infectividade. Quanto maior o número de dados colhidos na faixa de sobrevivência, menos empírico será o modelo proposto para descrição do fenômeno. Para tanto, concentração inicial mais alta na suspensão microbiana a ser estudada é mais indicada por permitir coletar maior número de dados na faixa entre sobrevivência e morte, onde sobrevivência significa concentração de agente inativante onde todos os organismos ainda estão vivos, e morte significa faixa onde só há ausência de sobreviventes. Através da modificação de uma das variáveis do modelo, p.ex. tempo de exposição ou concentração de um agente inativante viral, pode-se chegar a um conjunto de parâmetros que permita atingir uma faixa de inativação viral que garanta a possibilidade de não haver partículas viáveis após aplicação do método de inativação (FDA CFSAN 2000).

O título inicial viral obtido nesse trabalho (10^6 - 10^7 DICT₅₀/mL) embora característico para o PVA, é considerado baixo para este tipo de estudo. Outros autores desenvolvendo estudos de pressurização de amostras virais têm partido de amostras com alta densidade, na faixa de 10^6 a 10^{10} partículas por mL (SILVA et al., 1992; BONAFÉ et al., 2000; JURKIEWICZ, et al., 1995).

O baixo título inicial das suspensões do PVA não comprometeu a natureza da pesquisa, uma vez que já foi observado para outros vírus (p.ex. SIV, VSV e fago R-17) que o efeito da pressão sobre as partículas virais independe da concentração da suspensão.

A pressão permite estudar o comportamento dissociado de agregados protéicos. O processo dissociativo de dímeros é dependente da concentração. Todas unidades são indistinguíveis no que diz respeito à velocidade da dissociação. Ao se aumentar a concentração de proteína, é necessário um aumento na intensidade da pressão para que se obtenha o mesmo grau de dissociação. Em oligômeros e grandes agregados protéicos como partículas virais, o processo de dissociação pode ser descrito como um comportamento determinístico onde as partículas revelam características individuais de cada subunidade, que passa a se comportar independentemente (SILVA et al, 1992). A heterogeneidade das partículas virais nestas suspensões resultaria em um comportamento de “individualidade termodinâmica” passando pela inativação por pressão de forma independente. Proteínas compostas por muitas subunidades, como a eritrocruorina e hemocianina, apresentam semelhante independência dos efeitos da pressão sobre a concentração (SILVA et al, 1992; DaPOLAN et al., 1993; JURKIEWICZ et al., 1995). No entanto, TIAN et al., (2000), relataram que o IBDV apresenta dependência da concentração na queda do título viral quando as amostras virais são pressurizadas.

A alta pressão é capaz de dissociar algumas partículas virais bem como proteínas oligoméricas de forma irreversível ou parcialmente reversível quando voltam à pressão atmosférica. Dímeros (exemplo a enolase e hexoquinase) retomam rapidamente a atividade enzimática quando despressurizados. Para tetrâmeros (ex. lactato desidrogenase, gliceraldeído fosfato desidrogenase) o reaparecimento da atividade após descompressão ocorre mais lentamente (variando de horas até dias), e depende do tempo e magnitude da

pressão a que foram expostos. Quando agregados de grandes subunidades (como vírus icosaédricos) são totalmente dissociados pela pressão, não se observa a re-associação das subunidades. Observa-se, portanto, que o padrão de reversibilidade da dissociação e a retomada das propriedades nativas podem ser correlacionadas com o tamanho, número de subunidades do agregado protéico e pela complexidade das interações nos agregados originais (SILVA et al., 1989,1992, 1996; GASPAR et al., 1997). Quando as subunidades não estão em contato umas com as outras, sofrem alterações estruturais que acabam por originar uma partícula conformacionalmente (derivada) modificada em relação à nativa. Essa teoria tem recebido a denominação de “deriva conformacional” (WEBER, 1986; SILVA & WEBER, 1988; SILVA et al., 1989,1992).

Aparentemente para vírus envelopados, a inativação se dá não pela dissociação em subunidades, como o que ocorre em vírus não envelopados, mas sim pelo efeito produzido nas nucleoproteínas posicionadas na membrana lipídica. Partículas virais apresentam um padrão de complexidade maior do que o de proteínas oligoméricas, entre elas estão as interações do capsídeo com o ácido nucléico e nos vírus envelopados, as interações do capsídeo com lipídeos da membrana.

No PVA, as glicoproteínas de superfície G (de adesão) e F (de fusão) induzem a produção de anticorpos neutralizantes (SEAL et al., 2000). Essas proteínas estão ancoradas na membrana e estão em contato com as proteínas do capsídeo através da proteína de matriz (M) (Figura 1). Tem sido conjecturado que talvez este seja um sítio de ação da HHP sobre vírus envelopados como o PVA, inativando total ou parcialmente as partículas porém mantendo sua imunogenicidade.

SILVA et al., (1992) utilizando o VSV como modelo, sugeriram que a natureza eletrostática destas interações protéicas seria o fator determinante da sensibilidade à dissociação pela pressão. Os autores utilizaram esta abordagem para interpretar o forte efeito da pressão sobre a infectividade do VSV e manutenção da imunogenicidade da partícula.

Estudos de microscopia eletrônica de partículas virais pressurizadas têm mostrado que alterações morfológicas na superfície podem estar relacionadas com a inativação da

partícula viral e aumento ou manutenção da imunogenicidade. Partículas virais com envoltório lipoprotéico, como o VSV, quando expostas à pressão, apresentaram alterações morfológicas na superfície na forma de uma bolsa – uma protusão, porém a membrana lipídica se mostrou preservada e também foi possível observar o padrão espicular regular da proteína G (SILVA et al., 1992).

Observações microscópicas do HSV- tipo 1 e do HCMV após pressurização demonstraram que a pressão na faixa de 300 MPa provocou danos no envoltório viral. As partículas perderam capacidade de adesão às células HELA e VERO (NAKAGAMI et al., 1992).

Após incubação de amostras do vírus Mayaro, por 3 a 8 horas a 250 MPa, GASPAR (2000) observou que somente nas amostras pressurizadas por 8 horas foi detectada a presença de alterações na superfície da partícula. A morfologia observada para a partícula nativa e para as partículas pressurizadas por 3 horas foi a mesma. Os estudos de queda da infectividade destas suspensões mostraram que este vírus é resistente à pressão, sendo que após pressurização há uma alta taxa de inativação, mas há partículas sobreviventes e imunogênicas. Estas observações sugerem que a pressão estaria induzindo modificações conformacionais e gerando perturbações do sistema que não incluem a desmontagem.

TIAN et al., (2000) expuseram amostras do IBDV a pressões na faixa de 240 MPa. As observações de microscopia eletrônica evidenciaram alterações na superfície do envoltório viral. Apesar de não infectivas, as amostras pressurizadas apresentaram capacidade de produzir maior resposta imune do que as amostras não pressurizadas após inoculação em coelhos.

Estes resultados observados em diversos experimentos indicam que há um efeito nítido da HHP sobre membranas e que este fenômeno interfere na infectividade e imunogenicidade das partículas virais. A adaptação ao fundo do mar pode ser levada em conta na explicação do efeito da HHP sobre membranas. Em peixes colhidos em diferentes profundidades, o teor de lipídeos insaturados está relacionado com a pressão hidrostática do habitat natural, garantindo assim, a fluidez constante *in situ*. A alta pressão e a baixa temperatura agem na mesma direção no sentido de tornar membranas biológicas mais

rígidas, reduzindo sua fluidez, e provavelmente, interferindo em suas funções (CHONG & WEBER, 1983; GROSS & JAENICKE, 1994).

Há mais de três décadas, têm sido publicados estudos feitos com vários gêneros de bactérias. Estes trabalhos têm fornecido dados para avaliar o efeito da alta pressão na inativação da carga microbiana e manutenção do teor nutritivo de diversos tipos de alimentos. MORITA (1975 apud NAKAGAMI et al., 1992) postularam que a membrana celular é o sítio primário de danos da pressão sobre microrganismos e SHIGEHISA et al., (1991 apud FDA CFSAN, 2000) sugeriram que a pressão induz células bacterianas à morte por causar sérios danos à capacidade de permeabilização alterando a estrutura funcional da membrana celular.

Estas observações permitem sugerir que a alta pressão inativa vírus envelopados através de injúrias nas estruturas do envoltório viral. Tais evidências indicam um caminho para explicar o efeito da alta pressão sobre o padrão de infectividade e imunogenicidade do PVA pressurizado.

Nos estudos *in vitro* foi demonstrado que quanto maior a pressão de incubação, maior foi a redução na infectividade do PVA (Figura 4). Houve queda menor até 150 MPa e a partir desta faixa de pressão houve aumento franco na inativação da partícula viral.

A pressão de 250 MPa foi considerada uma faixa segura de trabalho uma vez que a pressão máxima da câmara utilizada é de 320 MPa. Os dados encontrados na literatura de inativação viral com pressão utilizam a faixa de 200 a 400 MPa com maior frequência, portanto, trabalhar nesta faixa permitiria uma análise dos resultados mais fundamentada (FDA CFSAN, 2000).

Os resultados apresentados na Tabela 1 e Figura 5, demonstraram que a queda de infectividade do PVA, quando exposto à pressão de 250 MPa a partir de 100 minutos, foi >5 log. Por extrapolação da reta obtida pela regressão linear dos títulos virais obtidos após exposição por todos os tempos de estudo, pode-se observar que após 120 minutos à esta pressão haveria queda no título viral >7 ou 8 log. Da mesma forma, a exposição por 150 minutos reduziria a infectividade da suspensão viral em > 8 a 9 log. Assim, a partir desses dados observa-se que quanto maior o tempo de exposição à pressão, maior a intensidade de

inativação do PVA e mais segura se tornaria uma suspensão viral inativada para ser utilizada como vacina. Esse estudo demonstrou que o PVA apresenta grande susceptibilidade à alta pressão e que seu grau de inativação é dependente do tempo de exposição à pressão.

Foi observada redução na infectividade de aproximadamente 4 a 5 log após 60 minutos a 250 MPa para o rotavírus bovino (PONTES 1991 e PONTES da SILVA 1999), para o FMDV (OLIVEIRA et al., 1997) e para o SIV (JURKIEWICKZ et al., 1995). O rotavírus símio se apresentou mais sensível à pressão que o isolado bovino, sendo que a incubação a 250 MPa por 30 minutos reduziu 4 log na infectividade da suspensão viral (PONTES et al., 1997).

Sensibilidade maior foi relatada para alguns retrovírus: 10 minutos de exposição à 400 MPa causou redução > 7 log para o HSV-1, 4 log para o HCMV, e 5,5 log para o HIV tipo 1 (NAKAGAMI et al., 1992, 2000). O IBDV apresentou sensibilidade maior a 0°C, sofrendo redução de > 4,5 log a partir de 60 minutos de exposição a 230 MPa (TIAN et al., 2000).

Estudos feitos com vírus não envelopados indicam que o efeito da alta pressão sobre estes vírus resulta do estado de deriva conformacional permanente de algumas das proteínas do capsídeo viral. PONTE da SILVA (1999), observou que a pressurização do rotavírus bovino (cepa UK) e símio (SA 11, variante 4S) resulta em partículas não infectivas e imunogênicas. Os dímeros da VP4 na forma de espículas na camada mais superficial da partícula, estariam mais expostos ao efeito da pressão, e este fenômeno causaria a queda da infectividade por impedir a atividade hemaglutinante do vírus. Porém a atividade imunogênica seria mantida porque parte da estrutura desta proteína estaria fortemente ligada ao capsídeo interno, e resistiria à pressurização. O mesmo foi observado para o IBDV quanto à VP2. A suspensão de IBDV pressurizada sofre inativação total mantendo sua funcionalidade imunogênica sendo capaz de gerar títulos de anticorpos da mesma grandeza que partículas nativas (TIAN, et al., 2000).

A BPL é um agente alquilante que reage com diversos agentes nucleofílicos, inclusive com ácidos nucleicos e proteínas. A BPL é um líquido incolor, solúvel em água que

modifica a estrutura de ácidos nucleicos após a reação principalmente com resíduos de purina (particularmente a guanina). A BPL induz a formação de cortes na fita de DNA, bem como o “cross-linking” entre DNA e proteínas e entre as fitas de DNA da dupla hélice. A BPL tem sido também utilizada em hospitais na forma de gás como agente esterilizante para produtos termo sensíveis por sua ação comprovada inclusive sobre esporos bacterianos. Uma desvantagem do uso deste agente é a suspeita de seu poder carcinogênico (PARKER et al., 1975). A BPL tem sido utilizada juntamente com o acetilenoimina (AEI) na produção de vacinas inativadas contra diversos agentes de doenças de importância veterinária como a raiva em cães, ou a doença da língua azul em vacas, doença de Newcastle, influenza e bronquite infecciosa em aves (FELLOWES, 1966; PARKER et al., 1975; STONE, 1993; LOMBARDINI, 1997).

Os estudos do efeito da BPL sobre o PVA tiveram como objetivo fornecer parâmetros para comparação da eficiência da pressão como agente inativante físico em relação a este agente químico. Na Tabela 2 foi demonstrado que abaixo de 0,05% o PVA apresenta resistência a BPL, porém a suspensão é totalmente inativada nas concentrações de 0,1 e 0,2%. Aumentando-se a concentração de BPL observou-se maior taxa de inativação do PVA. Abaixo de 0,1%, após contato de 2 horas com este agente, houve redução > 4,5 log na população inicial da suspensão viral. A exposição por 1 hora à concentração final de 0,025% foi capaz de causar 3 log de redução na infectividade enquanto que 2 horas de exposição à mesma concentração provocou redução de 4 log.

Os resultados dos estudos de cinética de inativação do PVA mostrados na Figura 6 e na Tabela 3 permitem comparar o efeito da pressão e da BPL isolada e combinada sobre a suspensão viral. Quando foi exposto somente à pressão 60 minutos a 250 MPa foi suficiente para reduzir no mínimo em 3 a 4 log a infectividade de uma suspensão de PVA com título inicial de aproximadamente $10^{6.5}$. O mesmo padrão de inativação foi observado quando esta suspensão viral foi exposta a BPL 0,025% por 60 e 120 minutos. A combinação da BPL 0,025% e a exposição a 250MPa por 30 minutos resultou em aumento marcante na taxa de inativação do vírus.

FELLOWES, (1966), observou que a exposição de suspensões de FMDV a BPL 0,05% por 15 minutos reduziu a infectividade em no máximo 2 log a suspensão viral. Esta

mesma suspensão inativada com BPL exposta à luz UV por 20 minutos produziu uma redução de no mínimo 7 log no título viral.

O efeito inativante da incubação de VSV com pressão isolada (250 MPa) foi aumentado em 3 log quando combinado com uréia 1 M, por 30 minutos (SILVA et al 1992).

De acordo com as observações de GASPAR (2000), a pressurização por 180 minutos a 200 MPa do vírus Mayaro reduziu em 7 log a infectividade da suspensão viral, porém não foi possível a inativação total da suspensão. A exposição isolada à luz UV (10^4 erg/mm²) por 30 minutos reduziu em 99% a população inicial. Já a combinação dos dois agentes foi mais eficiente tendo sido necessário quantidade menor de energia (10^3 erg/mm²) para obtenção de efeito inativante da mesma grandeza.

Estes resultados sugerem que o efeito molecular da pressão sobre fatores determinantes da infectividade das partículas virais pode ser potencializado por agentes químicos e físicos de caráter conhecidamente inativante. O nível de inativação deverá variar de vírus para vírus, dependendo também das condições.

6.2 Estudos *in vivo*

A pressão sempre altera seletivamente as propriedades de moléculas e sistemas biológicos complexos através da ruptura de associações não covalentes. Essa é a característica que originou o interesse no uso da pressão para produção de vacinas virais. A relação das proteínas do capsídeo umas com as outras, com a membrana lipídica, quando for o caso e com os ácidos nucléicos devem ser responsáveis pela infectividade específica, enquanto que em princípio uma estrutura covalente intacta das proteínas deve estar mais relacionada com a antigenicidade (JURKIEWICZ et al., 1995; SILVA et al., 1996).

Neste estudo foi observado que após a inoculação de galinhas com amostras de PVA inativadas pela pressurização a partícula viral manteve condições de produzir resposta imune. Os títulos de anticorpos obtidos nos soros das aves inoculadas com amostra de PVA inativada com pressão aos 21 dias de idade (Tabela 4), apresentaram a mesma ordem de grandeza que os títulos obtidos nas aves inoculadas no grupo controle.

A manutenção da imunogenicidade tem sido explicada por alguns autores trabalhando com vírus envelopados e não envelopados. A fusão de partículas virais à membrana da célula alvo é uma etapa da entrada da partícula no hospedeiro. Nos vírus envelopados, ela pode ocorrer diretamente entre a camada lipídica do envoltório viral e da célula hospedeira quando expostos a pH neutro, a exemplo do que ocorre com o HIV e com o PVA. A fusão indireta também pode ocorrer através da fusão de uma vesícula endocítica, formada pela membrana celular, e o envoltório viral quando expostos a pH baixo (GASPAR, 2000).

O estado de fusão intermediário tem sido observado em diversos vírus envelopados. Durante a fusão com a membrana celular, há mudanças na conformação de proteínas do capsídeo viral, bem como proteínas do envoltório viral, o que conduz à partículas temporariamente inativas. Este fenômeno também pode expor epítomos anteriormente ocultos, fundamentais para produção de resposta imune. PONTES et al. 1999 (apud PONTES da SILVA, 1999) observaram para o rotavírus alterações semelhantes às descritas para o HIV e para o vírus da influenza por NAKAGAMI et al., (2000), cujas glicoproteínas do envoltório passam por mudanças conformacionais ativadas pelo receptor celular.

Mudanças conformacionais irreversíveis causadas pela pressão nas glicoproteínas do envoltório viral, se assemelham às mudanças que ocorrem *in vivo* neste estado intermediário de fusão. GASPAR et al., 2000 (apud GASPAR, 2000) utilizaram a pressão como método para caracterização do estado ativo de fusão viral empregando dois modelos de vírus envelopados (Sindbis e Influenza). A pressão induziu a inativação do influenzavírus com decréscimo na atividade hemaglutinante, causando um efeito similar ao produzido quando o vírus se liga aos receptores celulares.

La CASSE et al., (1999) sugeriram o uso de complexos de fusão para vacinas de peptídeos sintéticos para o HIV. Os autores utilizaram formol para a fixação do complexo vírus-células e a partir desta reação produziram imunógenos capazes de permitir uma

resposta antigênica em muitos isolados do HIV. Apesar de eficiente, esta técnica impõe o limite de se necessitar a utilização de purificação viral, a qual é uma técnica bastante laboriosa. A vantagem da técnica de pressão sobre a de purificação viral é a capacidade que esta tem de produzir partículas virais eficientes para gerar resposta imune adequada e de uma forma mais simples e controlada.

Como pode ser observado na Tabela 4, para o grupo de aves somente inoculadas com PVA selvagem foi encontrado título soroneutralizante sem diferença significativa dos títulos obtidos em aves inoculadas com amostras pressurizadas (em média = 7,6). O PVA muitas vezes quando inoculados experimentalmente em aves não produz títulos soroneutralizantes elevados nem causa sinais respiratórios evidentes. Os títulos soroneutralizantes obtidos das galinhas inoculadas com as amostras pressurizadas (na faixa de 4 a 9) foram considerados dentro dos valores normais para este vírus quando há soroconversão. Títulos menores que 3 são considerados negativos para este vírus (HAFEZ & LOERHEN, 1990).

Alguns autores relataram o aumento da imunogenicidade de amostras virais pressurizadas quando comparados aos títulos produzidos pela inoculação de partículas não pressurizadas (PONTES da SILVA, 1999; TIAN et al., 2000).

Suspensões de rotavírus e de IBDV inativadas com pressão da ordem de 250 Mpa e inoculadas em coelhos mostraram que estas produziram títulos de anticorpos neutralizantes mais elevados do que suspensões de vírus não submetidas a técnica de pressurização (PONTES, 1991; TIAN et al., 2000 respectivamente). Estes resultados indicaram que a pressão hidrostática tornou as partículas virais altamente imunogênicas. Os autores sugeriram que para vírus envelopados, o aumento da imunogenicidade da partícula após tratamento com a pressão pode ser devido à exposição de sítios antigênicos posicionados entre a membrana celular, que quando estão em contato com a pressão atmosférica, não são naturalmente expostos devido às fortes interações entre subunidades protéicas.

Após administração de suspensão de PVA inativada pela BPL nas aves, 60% apresentou título soroneutralizante maior que 6; e o restante título até 8. Na Tabela 5 foi indicado o título médio das aves, e analisando-se os coeficientes de variação dos dados, houve um padrão de resposta bastante homogêneo para este grupo de tratamentos. Já os títulos de anticorpos obtidos nas aves inoculadas com a suspensão inativada pela combinação de agentes foram estatisticamente menores (média 6,1). O desvio padrão destes dados foi o maior encontrado em todo o experimento. Os resultados obtidos neste estudo indicam que a amostra viral inativada com a BPL isoladamente é capaz de produzir melhor resposta imune nas aves que aquela desenvolvida pela combinação deste agente com a pressão.

A obtenção de resposta imune estatisticamente igual àquela produzida pela BPL indica que provavelmente a pressão apresentou capacidade de causar uma alteração conformacional na partícula de PVA, que mantêm os sítios antigênicos intactos e funcionais com resposta da mesma grandeza que aquela produzida na produção de vacinas disponíveis comercialmente. Esta resposta permitiu que o trabalho seguisse para a fase final de desafio de campo.

Um dos objetivos do experimento de desafiar as aves inoculando amostras pressurizadas, era observar a possível manutenção do título de anticorpos neutralizantes anti o PVA em um nível acima ou próximo do considerado positivo após imunização e desafio.

Foi observado que as aves com 51 dias de idade por ocasião da inoculação da primeira dose de amostra de PVA inativada com pressão, apresentaram soroconversão (título de anticorpos soroneutralizantes > 3) somente duas semanas após aplicação da dose reforço (Figura 7). Um pico de anticorpos foi observado entre duas a quatro semanas após o desafio havendo uma queda para título soroneutralizante médio entre 5 e 6 de sete a onze semanas após o desafio.

Este fenômeno também é relatado em estudos de infecção experimental para este vírus, uma vez que nestas condições, anticorpos neutralizantes persistem 4 a 5 semanas, sofrendo queda após este período (ETERRADOSSI et al., 1995; COOK et al., 1989, 1995).

O grupo de aves controle positivo, somente desafiado também apresentaram comportamento semelhante na variação de títulos de anticorpos neutralizantes. A comparação das Figuras 7 e 8, permitem concluir que as aves que receberam amostra de PVA inativada com pressão responderam de forma mais rápida e melhor ao desafio do que as aves controle. O pico de anticorpos para as aves controle foi registrado somente 5 semanas após o desafio (título máximo de anticorpos neutralizantes = 8). Ao final de 13 semanas após o desafio a média de título ficou em 4.

JONES et al., (1988) também relataram variação semelhante no título de anticorpos em ensaios de infecção experimental em aves com PVA. Através de testes de SN foi detectado que por ocasião do aparecimento dos primeiros sintomas clínicos, o nível de anticorpos neutralizantes foi baixo, porém 5 a 7 dias após a inoculação foi observado um pico de anticorpos, enquanto que 4 semanas após a inoculação o título voltou a cair. Os autores ressaltaram que anticorpos neutralizantes persistem por aproximadamente 4 a 5 semanas, e seu título geralmente diminui após este período.

Títulos de anticorpos soroneutralizantes (em cultivo de traquéia de embrião de galinhas) da ordem de 10, foram observados por COOK et al.,(1989), testando vacina experimental para o vírus da rinotraqueíte dos perus de 4 semanas de idade. Duas semanas após inoculação com vacina atenuada, os autores encontraram os títulos SN mais altos, caindo para 8 a partir de 10 semanas após inoculação. Este padrão de resposta, provavelmente se refere à fase de franca resposta imunogênica observada normalmente em aves jovens uma a duas semanas após contato com amostras virais inativadas ou não.

Os resultados obtidos para os títulos de anticorpos determinados pelo teste de ELISA estão de acordo com os obtidos pela SN. Duas semanas após inoculação das aves com amostra inativada com pressão, somente 20% das aves apresentou soroconversão para o PVA. Os títulos de anticorpos aumentaram a partir deste período, sendo que por ocasião da

aplicação do desafio com amostra virulenta de PVA, 80% das aves já apresentavam título de anticorpos acima do ponto de corte do teste de ELISA utilizado.

O pico de título de anticorpos foi observado 4 semanas após aplicação do desafio, atingindo a faixa de $\log_2 10$ a $\log_2 12,4$, sendo que em seguida foi observada uma queda que se manteve até o final do estudo. Este aumento considerável de título após o desafio seguido de queda era esperado, tendo sido relatado por diversos autores em experimentos para avaliação de vacinas inativadas (GULLATI et al., 2001).

Após a aplicação do desafio, 100% das aves estavam soropositivas, sendo que até o final do experimento, (17 semanas após aplicação da amostra de PVA pressurizado) 75% das aves permaneceram nesta condição.

COOK et al., (1996) estudaram o efeito da administração de uma vacina atenuada, seguida de vacina inativada de PVA, na proteção de perus contra infecção respiratória e queda na produção de ovos. Foi observada uma queda no título de anticorpos determinados pelo ELISA, desde o momento da aplicação da vacina atenuada até 2 semanas após vacinação (de $\log_2 10,0$ para $\log_2 7,8$), sendo que nos períodos de 8, 16, 24 e 29 semanas após vacinação os títulos obtidos caíram ainda mais, ficando abaixo do nível considerado positivo (presença de anticorpos anti-TRT). O título de anticorpos sofreu um aumento 8 semanas após aplicação de vacina inativada, o que caracterizou uma forte resposta imune das aves frente este tipo de vacinação (aumento no título de: $\log_2 < 7$ para $\log_2 16$). Comparando-se este resultado ao que foi obtida no grupo que apenas recebeu amostra de vírus vivo atenuado, a resposta imunológica das aves que receberam amostra de vírus inativada foi mais alta. Os autores concluíram que as vacinas inativadas conferem às aves condição de apresentar resposta imunológica mais eficiente contra o PVA.

COOK et al., (1999) ao caracterizar o PVA isolado de perus apresentando doença respiratória nos EUA (estirpe Colorado) conduziram experimentos em galinhas (SPF) e perus (livres de anticorpos anti PVA maternos) mantidos em isoladores. As aves foram vacinadas com vacina atenuada (dos dois subgrupos de PVA: A e B) com um dia de idade, e desafiadas com cepa virulenta de PVA com três semanas de idade. O título de anticorpos foi determinado em todo o experimento (até 10 dias após o desafio) com teste de ELISA preparado com placas impregnadas com PVA, subgrupos A e B, e com o PVA/isolado

Colorado. As aves controle - aves não vacinadas e desafiadas, apresentaram título de anticorpos (de $\log_2 < 7,0$ a $\log_2 10,8$) similares aos obtidos após imunização e desafio com PVA nesta tese: O título de anticorpos das aves vacinadas três semanas após primeira foi $\log_2 < 7,0$ a $\log_2 10$, e 10 dias após a segunda vacinação estes títulos aumentaram atingindo valores de $\log_2 9,4$ a $\log_2 13,3$. O não aparecimento dos sinais clínicos demonstrou, portanto, eficiência da vacina em proteger as aves estudadas contra a SCI.

CATELLI et al., (1998) obtiveram títulos de anticorpos mais elevados do que os observados nesta tese. Os autores testaram uma vacina atenuada e uma inativada, sendo que os títulos de anticorpos médios das aves, determinados 2 semanas após desafio com TRTV de campo ficaram na faixa de $\log_2 > 13$.

No estudo com as aves mantidas em condições de campo, não foi possível observar sintomas clássicos de SCI em todas as aves controle positivo: aves não inoculadas com amostra pressurizada e desafiadas com amostra de PVA virulenta. Apenas três de 15 aves apresentaram presença de exsudato nasal oito dias após o desafio.

A rota escolhida para inoculação da amostra de PVA virulenta foi via óculo-nasal e gotejamento na água das aves. Alguns autores relatam que é de difícil compreensão, ou até mesmo desconhecido o motivo pelo qual observa-se que o PVA, que conhecidamente é um agente causal da SCI em condições de campo, pode ser capaz de reproduzir os sintomas da doença após inoculação da amostra para desafio via intramuscular, mas não após administração do vírus via nasal – a rota acreditada como sendo natural.

NAKAMURA et al., (1998) reproduziram a SCI em galinhas SPF inoculando suspensões do PVA e *E. coli* em aves de 4 semanas de idade. No grupo somente inoculado com PVA, duas semanas após inoculação o título soroneutralizante encontrado foi da ordem de 9 para aves inoculadas via nasal, e da ordem de 6 para aves inoculadas via ocular.

COOK et al., (2000) e MAJÓ et al., (1995) relataram que após inoculação óculo-nasal de suspensão de PVA em galinhas SPF mantidas em biotério, não foi possível observar influência da infecção na queda de postura e/ou na qualidade do ovo, bem como danos no trato reprodutivo das aves. Quando as aves foram inoculadas com a suspensão viral via

i.m., houve substancial queda na postura e alta incidência de ovos de má qualidade, além do que os sinais clínicos de doença observados nas aves foram semelhantes aos relatados após infecção natural no campo.

PANIGRAHY et al., (2000) observaram que em condições experimentais controladas os sinais clínicos e lesões dos animais são muito mais brandos do que o relatado para animais contaminados em campo. Em condições de campo, a contaminação bacteriana secundária é comum. Além disso, um grande número de hospedeiros susceptível está em contato próximo o que facilita o rápido espalhamento do vírus. Por outro lado, os animais em condições experimentais foram mantidos em ambiente relativamente limpo, levando a um número de hospedeiros susceptíveis, e conseqüentemente, um nível de espalhamento do vírus mais limitado.

A falta de correlação entre os resultados sorológicos e os sinais clínicos pode ser reforçada pelos relatos de vários autores, entre eles, COOK et al., (1987 apud PARREIRA, 1994) e PICAULT et al. (1987); OTSUKI et al., (1996), que também sugerem que esta “não correlação direta” entre a presença do vírus no soro de galinhas e o desenvolvimento da doença se deve à necessidade da presença de outros agentes secundários (geralmente *E. coli*) para que haja evolução para o quadro de SCI.

Um dos propósitos deste trabalho foi produzir uma amostra inativada com a mesma estirpe isolada no Brasil a partir de aves com SCI. O objetivo foi sugerir uma alternativa para a inativação da estirpe a qual, muito provavelmente, as aves dos plantéis nacionais estão ou são expostas. Desta forma, seria evitado de se adicionar uma nova estirpe no ambiente, ou ainda a possibilidade da cepa utilizada não conferir proteção cruzada por ocasião de exposição a sorotipos diferentes – PVA- A ou B.

Para ser utilizada como vacina de vírus inativado, uma suspensão viral deverá atender alguns requisitos, sendo os mais fundamentais a prova segura de inativação da partícula e a manutenção da sua capacidade imunogênica, o que requer integridade das partículas (SILVA, 1993). Em face aos resultados obtidos para o PVA neste estudo, a pressurização do vírus contempla os dois requisitos básicos para formulação de uma vacina citada acima. O uso da pressão no preparo de vacinas inativadas pode ter algumas vantagens sobre os

métodos de atenuação ou inativação química. As partículas atenuadas podem reverter após um certo tempo e causar a doença que deveria prevenir. O uso de subunidades tem a desvantagem de gerar resposta imune menos eficiente do que a gerada pela apresentação da partícula íntegra.

As suspensões de PVA pressurizadas são tão eficazes quando as partículas não pressurizadas em gerar títulos de anticorpos neutralizantes e para soro converter as aves protegendo-as de uma possível doença quando em contato com amostra virulenta. Na combinação de parâmetros estudados, estas suspensões poderiam ser utilizadas como imunógenos para preparação de vacinas inativadas para o PVA.

7 CONCLUSÕES

7.1 *Conclusão geral*

A alta pressão hidrostática aplicada sobre suspensões do PVA em MMEE foi capaz de produzir partículas inativadas a um nível não reversível porém imunogênicas o suficiente para estimular resposta imune similar à produzida em galinhas inoculadas com amostras virais inativadas quimicamente e com amostras virais virulentas. Os resultados obtidos neste estudo indicaram que também para o PVA, a alta pressão hidrostática se apresenta como alternativa de alto potencial para produção de vacina inativada. Os procedimentos de produção das suspensões inativadas são facilmente transferíveis para escala industrial, uma vez que esta metodologia já é utilizada em alguns segmentos da indústria de alimentos.

7.2 *Conclusões específicas*

1. A exposição de amostras do PVA SHS-119-BR por 120 minutos a pressão de 250 MPa foi capaz de reduzir a infectividade da suspensão viral em concentração inicial $10^{6,5}$ DITC₅₀/mL a níveis não detectáveis de replicação;
2. Intensidade não elevada de pressão, menor que 300 MPa, é necessária para reduzir o título infectante de partículas do PVA a um nível seguramente não reversível;
3. O agente químico betapropiolactona foi capaz de inativar totalmente (> 7 log) o PVA SHS-119-BR, em suspensão com título inicial $10^{6,5}$ DITC₅₀/mL, após contato por 120 minutos nas concentrações de 0,1 a 0,2%;
4. Houve potencialização do efeito inativante da BPL sobre a suspensão de PVA parcialmente inativada por este agente (0,025%) quando exposta à pressão de

250 MPa por 20 e por 30 minutos. Com esta combinação foi verificada redução total na infectividade (>7 log) da suspensão de PVA em concentração inicial de $10^{6,5}$ DITC₅₀/mL;

5. Galinhas SPF de 3 semanas de idade inoculadas com amostra de PVA SHS-119-BR inativada com pressão (250MPa/120 minutos) apresentaram soroconversão em nível estatisticamente igual às aves inoculadas com amostras totalmente inativadas com betapropiolactona (0,1%);
6. O padrão de soroconversão das aves SPF de 3 semanas de idade inoculadas com amostra de PVA pressurizada padronizada foi estatisticamente igual ao obtido com aves inoculadas com amostra de PVA selvagem mantidas em condições de biotério. O título soroneutralizante obtido para os dois tratamentos foi da ordem de $7 \pm 0,4$;
7. Galinhas SPF de 6 semanas de idade, imunizadas com amostra padronizada de PVA inativadas com pressão e desafiadas com amostra de PVA selvagem, apresentaram títulos de anticorpos semelhantes aos obtidos em aves inoculadas com amostra de PVA não inativada. Os títulos médios de anticorpos soroneutralizantes de 6,5 a 7 foi observado no período de 2 a 4 semanas após inoculação com amostra selvagem para os dois grupos de tratamentos .

SUMMARY

Animal virologists are continuously searching for and developing new vaccines in order to guarantee good health level of herds and to prevent economic loss in bird raising farms. The swollen head syndrome (SHS) is one of the many respiratory diseases affecting chicken, and it is associated to a member of *Paramyxoviridae*, the Avian Pneumovirus (APV). In the work presented here, it was studied the effect of high hydrostatic pressure on the APV by the analysis of the inactivation pattern and maintenance of the virus particle immunogenicity, aiming to assess the potential use of this physical method in killed virus preparation. It was used a partially purified APV sample isolated in Brazil. In the first phase, this work aimed to determine the kinetics of APV inactivation by exposing it from 50 to 300 MPa followed by the incubation for different times and a fixed pressure level. The infectivity reduction tests were performed *in vitro* with CER (Chicken Embryo Related) cell culture. Results indicated that the exposure of APV samples at a pressure range from 50 to 300 MPa for 60 minutes, caused a reduction of 0.3 to 4 log (respectively) in the virus infectivity of the viral suspension with initial concentration of $1 \times 10^{6.5}$ TICD₅₀/ml. When exposed for more than 100 minutes at 250 MPa, the APV suspensions infectivity decreased >5.5 log cycles. It was observed that the particle inactivation level is dependent incubation time at different pressure levels. In the second phase, it was determined the immune response pattern elicited in specific pathogen free 21-day-old chicken after inoculation with APV samples pressurized for 120 minutes at 250 MPa and the immune response pattern obtained was compared to the one of chicken inoculated with APV samples inactivated with Betapropiolactone and with those of chicken inoculated with virulent APV sample. The soroneutralising antibody titres (determined with *beta* soroneutralisation test) obtained for the studied groups indicated that HHP does not interfere with the immunogenicity of APV particle, since the pressure inactivated virus samples are capable of generating immune response comparable to that obtained when the chemically inactivated APV sample was inoculated to the chicken as well as when virulent APV sample was inoculated to them (CI 95%). In the third phase, 51-day-old chicken, were kept in an animal farm for 5 months simulating field conditions. After being immunized with the pressure inactivated APV samples, the chicken were challenged with virulent APV suspension. The serologic pattern was determined (ELISA and soroneutralization tests) until the egg laying phase. The seroconversion data indicated that the pressurization of APV samples inactivates the virus particle but keeps its immunogenic functionality enabling it to elicit antibody titres in chicken of similar magnitude of

those elicited when the birds are inoculated with native APV samples. The results obtained are in agreement with those reported by other authors working with attenuated and killed vaccines for the PVA, strongly suggesting that HHP represents a potential alternative for the production of APV inactivated vaccine.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS³

AL-ANKARI, A., BRADBURY, J.M., NAYLOR.C.J., WORTHINGTON, K.J., PAYNE-JOHNSON, C., JONES ,R.C. Avian Pneumovirus infection in broiler chicks inoculated with *Escherichia coli* at different time intervals. **Avian Pathology**, v. 30, p. 257-267, 2001.

ARNS, C.W. & HAFEZ H.M. Swollen head syndrome in poultry flocks in Brazil. In:41ST WESTERN POULTRY DISEASE CONFERENCE. 1992. Sacramento, CA, USA. **Proceedings**, 1992, p. 81-84.

ARNS, C.W. & HAFEZ H.M. Isolation and identification of Avian Pneumovirus from broiler breeder flocks in Brazil. In: 44TH WESTERN POULTRY DISEASE CONFERENCE. 1995. Sacramento, CA, USA. **Proceedings**, 1995. p. 124-125.

BAXTER-JONES, C., WILDING, G.B., GRANT, M. Immunofluorescence as a potential diagnostic method for turkey rhinotracheitis. **Veterinary Records**, v. 119, p. 600-601, 1986.

BONAFÉ, C.F.S., VITAL, C.M., TELLES, R.C., GONÇALVES, M.C., MATSUURA, M., PESSINE, F.B., FREITAS, D.R.& VEJA, J. Tobacco mosaic virus disassembly by high hydrostatic pressure in combination with urea and low temperature. **Biochemistry**, v. 37, p. 11097-11105, 1998.

BONAFÉ, C.F.S., GLASER, M., SILVA, J.L., VOSS, E.W., WEBER, G, SILVA, J.L. Virus inactivation by anilinaphtalene sulfonate compounds and comparison with other ligands. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 275, p. 955-961, 2000.

³ De acordo com ABNT 6023 ago 2000. Informação e documentação – Referências – Elaboração

BRAUCH G., HAGLER U., LUDWIG H. The effect of pressure on bacteriophages. **High Pressure Research**, v. 5 ,p. 767-769, 1990.

BUYS,S.B & DuPREEZ, J.H. A preliminary report on the isolation of a virus causing sinusitis in turkeys in south Africa and attempts to attenuate the virus. **Turkeys**, v. 28, p. 36-46,1980.

BUYS,S.B, DuPREEZ, J.H., ELS, H.J. Swollen Head Syndrome in chickens; a preliminary report on the isolation of a possible aetiological agent. **Journal of the Veterinary Association**, v. 60, p. 221-222, 1989.

CASTRO, T.M. **Caracterização do Pneumovírus Aviário isolado no Brasil**. 1999. Tese (Doutorado em Microbiologia) Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil.

CATTELI, E., COOK, J.K. A., CHESHER, J., ORBELL, S.J., WOODS, A. BAXENDALE, W., HUGGINS, M.B. The use of virus isolation, histopathology and immunoperoxidase techniques to study the dissemination of a chicken isolate of Avian Pneumovirus in chicken. **Avian Pathology**, v. 27, p. 632-640,1998.

CHEATTLE, N.J. The use of an emulsion vaccine against turkey rhinotracheitis and swollen heads syndrome in chickens. **British Veterinary Journal**, v. 147, p. 49-50,1991.

CHONG P.L.G., & WEBER, G. Pressure dependence of 1,6-diphenil-1,3,5-hexatriene fluorescence in single-component phosphatidilcholine liposomes. **Biochemistry**, v. 22, p. 5544-5550, 1983.

CLARK, S. A Review of Avian Pneumovirus. Technical Supplement. In: ROCHE AVIAN PNEUMOVIRUS WORKSHOP. ed. S.R. Clark and L.M. Ginsburg. Roche Vitamins Inc., 2001. Parsippany NJ. RCD 9713. **Proceedings**, 2001. pp. 21-24.

COLLINS, M.S., GOUGH, R.E., LISTER, S.A., CHETTLE, N., EDDY, R. Further characterization of a virus associated with turkey rhinotracheitis. **Veterinary Records**, v. 119, p. 606-610, 1986.

COLLINS, M.S., GOUGH, R. Characterization of a virus associated with turkey rhinotracheitis. **Journal of General Virology**, v. 69, p. 909-916, 1988.

COLLINS, M.S., GOUGH, R.E. & ALEXANDER, D.J. Antigenic differentiation of Avian Pneumovirus isolates using polyclonal antisera and mouse monoclonal antibodies. **Avian Pathology**, v. 22, p. 469-479, 1993.

COOK, J.K.A., DOLBY, C.A., SOUTHEE, D.J., MOCKETT, A.P.A. Demonstration of antibodies to turkey rhinotracheitis virus in serum from commercially reared flocks of chickens. **Avian Pathology**, v. 17, p. 403-410, 1988.

COOK, J.K.A., HOLMES, H.C., FINNEY, P.M., DOLBY, C.A., ELLIS, M.M. & HUGGINS, M.B. A live attenuated turkey rhinotracheitis virus vaccine. 2. The use of the strains as an experimental vaccine. **Avian Pathology**, v. 18, p. 523-534, 1989.

COOK, J.K.A., ELLIS, M.M. & HUGGINS, M.B.. The pathogenesis of turkey rhinotracheitis virus in turkey poults inoculated with the virus alone or together to strains of bacteria. **Avian Pathology**, v. 20, p. 155-166, 1991.

COOK, J.K.A., HUGGINS, M.B., WOODS, M.A., ORBELL, S.J., MOCKET, A.P.A. Protection provided by a commercially available vaccine against different strains of turkey rhinotracheitis virus. **Veterinary Record**, v. 136, p. 392-393, 1995.

COOK, J.K.A., ORTHEL, S., WOODS, M.A. & HUGGINS, M.B. An experimental turkey rhinotracheitis (TRT) infection in breeding turkey and the prevention of its clinical effects using live-attenuated and inactivated TRT vaccines. **Avian pathology**, v. 25, p. 231-243, 1996.

COOK, J.K.A. Doenças respiratórias em galinhas, incluindo a significância do pneumovirus aviário. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLA, 1997, São Paulo, SP. p. 29-43.

COOK, J.K.A.; HUGGINS, M.B, ORBELL, S. J., SENNE, D. A. Preliminary antigenic characterization of an Avian Pneumovirus isolated from commercial turkeys in Colorado, USA. **Avian Pathology**, v. 28, p. 607-617, 1999.

COOK, J.K.A., CHESHER, J., ORTHEL, F., WOODS, M.A., ORBELL, S.J., BAXENDALE W., HUGGINS, M.B. Avian Pneumovirus infection of laying hens: experimental studies. **Avian Pathology**, v. 29, p. 545-556, 2000.

COSWIG, L.T. **A presença de anticorpos contra Pneumovirus Aviário nas regiões Sul e Sudeste do Brasil**. 1998. Tese. (Mestrado) .Universidade Federal de Pelotas, UFPEL, Pelotas, Rio Grande do Sul.

CROWTHER, J.R. **ELISA – Theory and Practice**, Humana Press, 1995, Totowa, NJ, 223 pp.

DANI, M.A.C., DURIGON, E.L., ARNS, C.W. Molecular characterization of Brazilian avian pneumovirus isolates: comparison between immunochemiluminescent Southern blot and nested PCR. **Journal of Virological Methods**, v.79, p237-241, 1999.

DaPOIAN, A.T., OLIVEIRA, GASPAR, L.P., SILVA,J.L., WEBER, G. Reversible pressure dissociation of R17 bacteriophage: the physical individuality of virus particles. **Journal of Molecular Biology**,v. 231, p. 999-100, 1997.

DAR, E.M., MUNIR, S., GOYALL, S.M., ABRAHANSESN, M.S., KAPUR,V. Sequence analysis of the nucleocapsid and phosphoprotein genes of Avian Pneumoviruses circulating the US. **Virus Research**,v. 79 n. (1-2), p. 15-25. 2001.

DIAZ de ESPADA, E. & PERONA, M.E. Etiologia del síndrome de cabeza hinchada. **Revista de la Sección Española de la Asociación Mundial de Avicultura Científica**, v. 40, p.36-42, 1984.

DROUAL, R., BICKFORD, A.A., CHARLTON, B.R., KUNEY, D.R. Investigation of problems associated with intramuscular breast injection of oil adjuvant killed vaccines in chickens. **Avian Diseases**, v. 34, p. 473-478, 1990.

EASTON, A. Avian Pneumovirus. 1997. ae@dna.bio.warwick.ac.uk
<http://thunnus.oikos.warwick.ac.uk/~bioaae/apv.html>. Acesso em 2001.

ETERRADOSSI, N., TOQUIN, D., GUITTET, M., BENNEJEAN, G. Discrepancies in turkey rhinotracheitis ELISA results using different antigens. **Veterinary Record**, v. 131, p. 563-564, 1992.

ETERRADOSSI, N., TOQUIN, D., GUITTET, M., BENNEJEAN, G. Evaluation of different Turkey Rhinotracheitis viruses used as antigens for serological testing following the vaccination and challenge. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 42, p. 175-186, 1995.

FDA CFSAN. Kinetics of Microbial Inactivation for Alternative Food Processing Technologies: High Pressure Processing. U. S . Food and Drug Administration Center for Food Safety and Applied Nutrition. June 2, 36 pp. 2000.

FELLOWES, O.N. Comparison of the inactivation and antigenicity of Foot-and-mouth-disease virus by acetyleneimine and by combined effect of ultraviolet light and β -propiolactone. **Journal of Immunology**, v. 95, p. 1100-1106, 1966.

GASPAR, L.P., JOHNSON, J.E., SILVA, J.L., DaPOIAN, A.T. Partially folded states of the capsid protein of Cowpea Severe Mosaic Virus in the disassembly pathway. **Journal of Molecular Biology**, v.273, p. 456-466, 1997.

GASPAR, L.P. **Estudo do estado fusogênico, dos mecanismos de inativação e da desmontagem de nucleocapsídeos de vírus envelopados.** 2000. Tese (Doutorado em Química Biológica) Depto. de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

GIRAUD, P., BENNEJEAN, G., GITTET, M., & TOQUIN, D. Turkey rhinotracheitis in France: preliminary investigations on a ciliostatic virus. **Veterinary Record**. v. 119, p. 606-607, 1986.

GOUGH, R.E., & COLLINS, M. S. Antigenic relationships of three turkey rhinotracheitis viruses. **Avian Pathology**, v. 18, p. 227-238, 1989.

GOUGH, R. E. **Avian Pneumovirus – Recent Developments.** Veterinary Laboratories Agency (Weybridge) Addlestone, Surrey, KT15 3 NB United Kingdom. 2000.

GULATI, B.R., PATNAYAK, D.P., SHEIKH, A.M., POSS, P.E., GOYAL, S .M. Protective efficacy of high passage Avian Pneumovirus (APV/MN/turkey/1-a/97) in turkeys. **Avian Diseases** v. 45, p. 593-597, 2001.

GRANT, M., BAXTER-JONES, C., WILDING, G. P. An enzyme linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of turkey rhinotracheitis infection. **Veterinary Records**, v. 21, p. 279-280, 1987.

GROSS, M. & JAENICKE, R. Protein under pressure. The influence of high hydrostatic pressure on the structure, function and assembly of protein and protein complexes. **European Journal of Biochemistry**, v. 221, p.617-630, 1994.

HAFEZ, H. M. Swollen Head Syndrome: Potential risk for broiler and broiler breeder. In: XXVITH ANNUAL CONVENTION ISRAEL BRANCH WPSA, 1988, Zichron, Israel, **Proceedings**, 1988, p. 39.

HAFEZ, H.M. & LOERHEN, U. 1990. Swollen Head Syndrome: clinical observations and serology in West Germany. **Tieraerztliche Umschau**, v. 97: p. 322-324, 1990.

HAFEZ, H.M. & WEILAND, F. Preliminary studies of a virus associated with Turkey Rhinotracheitis in West Germany. **Tieraerztliche Umschau**, v. 45, p. 103-111, 1990.

HAFEZ, H.M. Turkey rhinotracheitis: review and experience in Germany. **Wiener Tieraerztliche Monatsschrift**, v. 78, p. 195-200, 1991.

HAFEZ, H.M. 1992. The role of pneumovirus in swollen head syndrome . In: *Apinco*.

HECKERT, R.A., MYERS, D.J., AFSHAR, A. RIVA, J. 1994. Development and evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies to Avian Pneumovirus. **Avian Diseases**, v. 38, p. 695-700, 1994.

JONES, R.C., WILLIAMS, R.A. BAXTER-JONES, C., SAVAGE, C. E.& WILDINGS G.P. Experimental infection of laying turkeys with rhinotracheitis virus: distribution and serological response. **Avian Pathology**, v. 17, p. 841-850, 1988.

JONES, R.C. Avian pneumovirus infection: questions still unanswered. **Avian Pathology**, v. 25, p. 639-648, 1996.

JUHASZ, K., EASTON, A. J. Extensive sequence variation in the attachment (G) protein gene of avian pneumovirus evidence for two distinct subgroups. **Journal of General Virology**, v. 75, p. 2873-2880, 1994.

JURKIEWICZ, E., VILLAS-BOAS, M., SILVA, J. L., WEBER, G., HUNSMANN ,G., CLEGG, R. M. Inactivation of Simian Immunodeficiency Virus by hydrostatic pressure. **Proceedngs of the National Academy of Science – USA**. v. 92, p. 6935-6937, 1995.

LaCASSE, R.A., FOLLIS, K.E., TRAHEY, M., SCARBOROUGH, J.D., LITTMAN, D.R., & NUNBERG, J.H. Fusion-competent vaccines: broad neutralization of primary isolates of HIV. **Science**, v. 283, p. 357-362, 1999.

LOMBARDINI, F. Comunicação Pessoal, 1997.

LU, Y.S., SHIEN, Y.S., TSAI, H J., TSENG, C. S., LEE, S.H., & LIN, D.F. Swollen head syndrome in Taiwan – isolation of an Avian Pneumovirus and serological survey. **Avian Pathology**, v. 23, p. 169-174, 1994.

MAJÓ, N., ALLAN, G.M., O'LOAN, C., PAGÉS, A. & RAMIS, A. J. A sequential histopathological and immunocytochemical study of chickens, turkeys poults, and broiler breeders experimentally infected with turkey rhinotracheitis virus. **Avian Diseases**, v. 39, p. 887-896, 1995.

MASSON, P. TONELLO, C., BALNY, C. High hydrostatic pressure biotechnology in medicine and pharmaceutical science. **Journal Biomedicine and Biotechnology**, v. 1-2, p. 85-88, 2001.

MEKKES D.R. & WITT, J.J. Comparison of three commercial ELISA kits for the detection of Turkey Rhinotracheitis Virus antibodies. **Avian Pathology**, v. 27, p. 301-305, 1988.

MONTEIRO, C.M. **Pneumovírus Aviário (PVA): avaliação sorológica com diferentes testes em aves comerciais**. 2001. Tese (Mestrado em Microbiologia) Instituto de Biologia , Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil.

MORLEY, A. J. & THOMSON, D. K. Swollen head syndrome in broiler chickens. **Avian Diseases**, v. 28 , p. 338-343, 1984.

NAKAGAMI, T., OHNO, H., SHIGESA, T. Inactivation of Human Immunodeficiency Virus by high hydrostatic pressure. **Transfusion**, v. 40, p. 475-476, 2000.

NAKAGAMI, T., SHIGESA, T., OHMORI, T., TAJI, S., HASE, A., KIMURA, T., YAMANISHI, K., 1992. Inactivation of Herpes Viruses by high hydrostatic pressure. **Journal of Virological Methods**, v. 38, p. 255-262, 1992.

NAKAMURA, K., MASE, M., TANIMURA, S., YAMAGUCHI, S., & YUASA, N. Attempts to reproduce swollen head syndrome in specific pathogen free chicken by inoculating with *Escherichia coli* and/or turkey rhinotracheitis virus. **Avian Pathology**, v. 27, p. 21-27, 1998.

NANDAPALAN, N., WILCOX, G.E. & PENHALE, W.J. Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies to Infectious Bronchitis Virus. **Avian Diseases**, v. 26: p. 171-176.1982.

NAYLOR C.J., JONES, R.C. Turkey rhinotracheitis: a review. **Veterinary Bulletin**, v. 63, p. 439-449, 1993.

NAYLOR C.J., SHAW, K., BRITTON, K. P., CAVANAGH, D. Appearance of type B avian pneumovirus in Great Britain. **Avian Pathology**, v. 26, p.327-338, 1997.

O'BRIEN, J. D. P. Swollen head syndrome in broiler breeders. **Veterinary Record**, v. 117, p. 619-620, 1985.

OLIVEIRA, A. ISHIMARU, GONÇALVES R., SMITH, T., MASON, P.SÁ-CARVALHO, D., SILVA, J. L. Low temperature and pressure stability in Picornavirus: Implications in virus uncoating. **Biophysical Journal**, v. 76, p. 1270-1279, 1997.

OTSUKI, K., HIRAI, N., MITANI, M., SHIMOHATA, T., KUNII, E., URAMOTO, K., KIYOTAKE, M., KATO, H., ELLIS, M.M., COOK, J.K.A.. Demonstration of serum-neutralising antibody to turkey rhinotracheitis virus in serum from chicken flocks in Japan. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 58, p. 869-874, 1996.

PALADINI, A.A. & WEBER, G. Absolute measurements of fluorescence polarization at high pressures. **Review of Scientific Instruments**, v. 52, p. 417-27, 1981.

PANIGRAHY, B., SENNE, D.A., PEDERSON, J.C., GIDLEWSKI, T. & EDSON, R.K. Experimental and serologic observations on Avian Pneumovirus (AVP/turkey/Colorado/97) infection in turkeys. **Avian Disease**, v. 44, p. 17-22, 2000.

PARKER J., HERNIMAN, K.A., GIBBS, E.P., SELLERS. R.F. An experimental inactivated vaccine against bluetongue. **Veterinary Record**, v. 96, p. 284-287, 1975.

PARREIRA, R.V. Síndrome da Cabeça Inchada em galinhas (SHS): detecção sorológica do vírus da Rinotraqueíte de Perus (TRTV) e caracterização dos fatores de virulência de *Escherichia coli*. São Paulo - SP; 1994. [Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual de São Paulo - USP, São Paulo].

PARREIRA, V.R., ARNS, C.W., YANO, T. Virulence factors of avian *Escherichia coli* associated with swollen head syndrome. **Avian Pathology**, v.27, p.148-154, 1998.

PATTISON, M. CHETTLE, N., RANDAL, C.J. & WYETH, P. J. Observations on swollen head syndrome in broiler and broiler breeder chicken. **Veterinary Record**, v. 125, p. 229-231, 1989.

PEDERSEN, J.C., SENNE, D.A. , PANIGRAHY, B., REYNOLDS, D.L. Detection of Avian Pneumovirus in tissues and swab specimens from infected turkeys. **Avian Diseases**, v. 45, p. 581-592, 2001.

PICAULT, J.P., GIRAUD, P., DROVIN, P., GUITTET, M., BENNEJEAN, G., LAMANDE, J., TOQUIN, D. & GUEGUEN, C. Isolation of a TRTV-likevirus from chickens with swollen head syndrome. **Veterinary Record**, v. 121 p. 135, 1987.

PONTES da SILVA, L. **Efeitos de altas pressões sobre as proteínas virais do Rotavírus e do Bacteriófago P-22. Aplicações Biotecnológicas.** 1999. Tese (Doutorado em Bioquímica Médica) Departamento de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1999, Rio de Janeiro, Brasil.

PONTES, L., FORNELLS, L. A. , GIONGO, V., ARAUJO, J. R., SEPULVEDA, A., VILLAS-BOAS, M., BONAFÉ, C. F. S., SILVA, J. L. Pressure inactivation of animal viruses: Potential Biotechnological applications. **High Pressure Research in the Biosciences and Biotechnology**, K. Heremans ed. Leuven. University Press, 1997, Leuven, Belgium.

PONTES, L. **Efeitos da pressão hidrostática sobre o rotavírus: perda da infectividade e manutenção da imunogenicidade.** 1991. Tese (Mestrado em Química Biológica) Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ.

SANTOS C. H. C. & SILVA, E. N.. Métodos de diagnósticos laboratoriais microbiológicos e sorológicos. In: **Doenças das Aves.** BERCHIERE Jr., A. & MACARI, M eds. FACTA, Campinas, p.178-180, 2000.

SEAL, B. Matrix protein gene nucleotide and predicted amino acid sequence demonstrate that the first US avian pneumovirus isolate distincts from European strain. **Virus Research**, v. 58, p. 45-52, 1998.

SEAL, B., SELLERS, H.S., MEINERSMANN, R.J. Fusion protein predicted amino acid sequence of the first US avian pneumovirus isolate and lack of heterogeneity among US isolates. **Virus Research**, v. 66, p. 139-147, 2000.

SENNE, D.A., EDSON, R. K., PEDERSEN, J. C., PANIGRAHY, B.. Avian Pneumovirus update. In: AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION 134TH ANNUAL CONGRESS, 1997, Reno, NV. **Proceedings**, p190, 1997.

SILVA, E.N., ARNS, C.W., SILVA, J.M.L. Observações sobre a síndrome da cabeça inchada em matrizes pesadas no Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 3, p. 210-222, 1994.

SILVA, J.L. & WEBER, G. Pressure induced dissociation in Brome Mosaic Virus. **Journal of Molecular Biology**, v. 199, p. 149-161, 1988.

SILVA, J.L., VILLAS-BOAS, M., BONAFÉ, C.F., & MEIRELES, N.C. Anomalous pressure dissociation of large protein aggregates. Lack of concentration dependence and irreversibility at extreme degrees of dissociation of extracellular hemoglobin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 264, p. 15863-15868, 1989.

SILVA, J.L., LUAN, P., GLASER, M., VOSS, E. & WEBER, G. Effects of hydrostatic pressure on a membrane-enveloped virus: high immunogenicity of the pressure-inactivated virus. **Journal of Virology**, v. 66, p. 2111-2117, 1992.

SILVA, J.L., WEBER, G. Pressure stability of protein. **Annual Review of Physical Chemistry**, v. 27, p. 7108-7115, 1993.

SILVA, J.L., FOGUEL, D., DaPOIAN A .T. & PREVELIGE, P. E. The use of hydrostatic pressure as a tool to study viruses and other macromolecular assemblages. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 6, p. 166-175, 1996.

SMITH, A. L., TIGNOR, G.H., MIFUNE, K. Isolation and assay of rabies serogroup viruses in CER cells. **Intervirology**, v. 8, p. 92-99, 1977.

STONE, H.D. Efficacy of experimental animal and vegetable oil-emulsion vaccines for Newcastle Disease and Avian Influenza. **Avian Diseases**, v. 37, p. 399-405, 1993.

SUAREZ, M.C. **Estados conformacionais do domínio N-terminal recombinante da troponina C e da tropomiosina induzidos por alta pressão hidrostática e baixas**

temperaturas. 1995. Tese (Mestrado em Bioquímica Médica), Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. RJ.

TANAKA, M., TAKUMA, H., KOKUMAI, N., OISHI, E., OBI, T., HIRAMATSU, K., & SHIMIZU, Y. Turkey Rhinotracheitis virus isolated from broiler chicken with swollen head syndrome in Japan. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 57, p. 939-941, 1995.

TIAN, S. RUAN, K., QIAN, J., SHAO, G., BALNY, C. Effects of hydrostatic pressure on the structural and biological activity of the infectious bursal disease virus. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, p. 4486-4494, 2000.

URAMOTO, K., HAKOGI, E., WATANABE, T., OGURA, Y., HATAYA, M., OTSUKI, K. Primary occurring of swollen head syndrome in Japanese broiler flocks. **Journal of the Japanese Society on Poultry Diseases**, v. 26, p. 241-253, 1990.

VAN de ZANDE, S., NAUWYNCK, H., PENSAERT, M. The clinical, pathological and microbiological outcome of an *Escherichia coli* O2:K1 infection in Avian Pneumovirus infected turkeys. **Veterinary Microbiology**, v. 81, p. 353-365, 2001.

WEBER, G. Phenomenological description of the association of protein subunits subjected to conformational drift. Effects of dilution and hydrostatic pressure. **Biochemistry**, v. 25, p. 3626-3631, 1986.

WEBER, G. **Protein interactions**. Chapman and Hall eds. New York and London. 1992.

WEBER, G. Thermodynamics of the association and the pressure dissociation of oligomeric proteins. **Journal of Physical Chemistry**, v. 97, p. 7108-7115, 1993.

WILLIAMS, R.A., SAVAGE, C.E., WORTHINGTON, K.J., JONES, R.C. Further studies on the development of a live attenuated vaccine against turkey rhinotracheitis. **Avian Pathology**, v. 20, p. 585-596, 1991.

WYETH, P. J., CHETTLE, N.J., GOUCH, R.E. & COLLINS, M.S. Antibodies to TRTV in chickens with swollen head syndrome. **Veterinary Record**, v.119, p.139-144, 1987.