

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA**



Terezinha Aparecida Martins Gomes de Castro

**Caracterização de isolados brasileiros de Pneumovírus
Aviário (PVA).**

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato(a) Terezinha Aparecida Martins Gomes de Castro e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do título de Doutor em Ciências na Área de Bioquímica.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Clarice Weis Arns

9919622

1999

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	UNICAMP
	C279c
V.	Es.
TOMADO	80/39384
PROC.	229/99
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	09/11/99
N.º CPD	

CM-00136660-0

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

C279c

Castro, Terezinha Aparecida Martins Gomes de

Caracterização de isolados brasileiros de Pneumovirus
Aviário (PVA)/Terezinha Aparecida Martins Gomes de Castro.--
Campinas, SP:[s.n.], 1999.

82f.:ilus.

Orientadora: Clarice Weis Arns

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia.

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

Data da Defesa: 13/10/1999

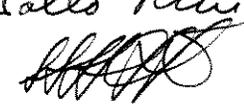
Banca Examinadora

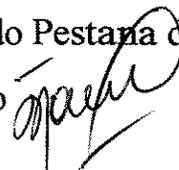
Titulares:

Profa. Dra. Clarice Weis Arns (orientadora) 

Profa. Dra. Maria Sumiko Arita Matsuura

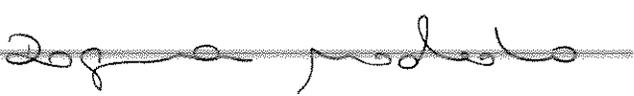
Profa. Dra. Lucila Costallat Ricci 

Prof. Dr. Antonio Fernando Pestana de Castro 

Prof. Dr. Tomomasa Yano 

Suplentes:

Prof. Dr. Carlos Francisco Sampaio Bonafé

~~Profa. Dra. Dagmar Ruth Stach Machado ~~

Ao meu esposo Fernando e minhas filhas

Maria Ângela,

Alessandra Marnie,

Maria José,

Tatiane Marie e

Fabiana Maria

pela paciência, apoio e estímulo.

Agradecimentos

- A Prof.^a Dr.^a Clarice Weis Arns pela orientação, confiança e amizade no trabalho desenvolvido.

 - Ao Laboratório Estadual de Veterinária de Stuttgart (Alemanha) pelo fornecimento de isolados de PVA

 - Ao Prof. Dr. Aureo T. Yamada, do Centro de Microscopia Eletrônica da UNICAMP, Campinas, pelo auxílio na Microscopia Eletrônica e realização das fotomicrografias eletrônicas.

 - Aos professores e funcionários do Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas pela amizade e confiança.
-
- Aos colegas de pós-graduação do Departamento de Microbiologia e Imunologia pela amizade e apoio.

Resumo

O pneumovirus aviário (PVA) causa infecção aguda no trato respiratório em perus (rinotraqueite de perus) e galinhas (síndrome da cabeça inchada) com início abrupto e disseminação. No presente trabalho foram estudados dois isolados de PVA: SHS BR-119 e SHS BR-121 quanto a morfologia, sorologia, cultivo em anel de traqueal, inoculação experimental em aves SPF, propriedades físico-químicas e perfil eletroforético em PAGE-SDS frente a quatro isolados de PVA de diferentes origens. Inicialmente, todos os isolados de PVA foram inoculados e adaptados em culturas de células CER para produção de antígenos, que resultou em títulos virais variando de $10^{5.5}$ a $10^{6.5}$ TCID₅₀/ml. Em cultivo de anel traqueal observou-se ciliostase na segunda passagem apenas em uma das amostras virais analisadas. O estudo físico-químico demonstrou que os isolados brasileiros tratam-se de vírus RNA envelopados, termolábeis e sem atividade hemaglutinante e de hemadsorção. As observações morfológicas à microscopia eletrônica demonstraram ser um vírus pleomórfico e espiculado. O perfil eletroforético em PAGE-SDS demonstrou uma composição similar dos polipeptídeos virais entre as diferentes amostras estudadas. Os antissoros produzidos a partir dos vírus purificados foram utilizados no teste de soroneutralização cruzada. Os resultados deste ensaio mostraram que as duas cepas virais brasileiras cruzam com as outras cepas estudadas, confirmando a ocorrência de semelhanças antigênicas amplamente descritas na literatura internacional. O resultado do estudo sorológico do PVA em aves matrizes mostrou que das 901 amostras de soro analisadas através dos testes de ELISA e soroneutralização, ambos os testes demonstraram uma positividade anti-SHS BR-119 (67% e 66,5% respectivamente). Também foram analisadas 724 amostras de soro de frangos de corte através dos testes de ELISA e SN com positividade de 2,9% e 5,1%, respectivamente

Abstract

Avian Pneumovirus (APV) causes an acute respiratory tract infection both in turkeys (turkey rhinotracheitis) and chicken (swollen head syndrome) with sudden onset and rapid spread through the flocks. In this work were characterized two types of avian pneumovirus from brazilian chicken by electron microscopy, serological analysis (serum neutralization and ELISA tests), physico-chemical properties (thermostability, chloroform sensitivity, effect of IUDR and pH, haemagglutination and haemodsortion tests) and compared its polypeptide composition with four other avian pneumoviruses using SDS-PAGE. All isolates from APV were propagated in cells cultures of CER for antigens production with titre varying from $10^{5.5}$ to $10^{6.5}$ TCID₅₀/ml. Only one isolated showed ciliostasis after the second passage. The physico-chemical tests and morphological observation showed that brasilian's isolates are pleomorphic RNA viruses, spicular, enveloped, thermolabile and not haemagglutinating. The SDS-PAGE profile of the viruses were very similar. Virus neutralisation tests revealed non reaction of the two brazilian isolates with the other different isolates. Nine hundred one serum samples of breeders and seven hundred twenty four serum samples of broilers were analysed using the serological tests of serum neutralization (SN) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and both tests showed serum positivity, respectively, 66.5 and 67% to breeders and 5.1 and 2.9 to broilers. In the experimental inoculation of SPF birds with two brazilian isolates and one germany isolated observed serological conversion after the first inoculation

ÍNDICE

	páginas
I- INTRODUÇÃO	(1)
II- REVISÃO DE LITERATURA	(3)
1- Definição	(3)
2- Histórico	(3)
3- Etiologia	(5)
3.1 – Histórico	(5)
3.2 – Classificação	(6)
3.3 - Taxonomia do Paramixovirus	(8)
3.4 - Propriedades estruturais dos Paramixovirus	(9)
3.5 - Propriedades do Pneumovirus Aviário (PVA)	(9)
3.6 - Diversidade Antigênica	(11)
3.7 - Multiplicação Viral	(13)
3.8 – Patogenia	(13)
3.9 – Epizootiologia	(15)
3.10 - Sinais clínicos, morbidade, mortalidade	(16)
3.11 – Sintomatologia	(17)
 3.12 - Alteração Histopatológica	(17)
3.13 – Imunologia	(18)
3.14 – Diagnóstico	(18)
3.15 – Sorologia	(20)
3.16 - Escolha e tempo das amostras para o isolamento	(22)
3.17 - Técnicas de Isolamento	(22)

III- MATERIAL E MÉTODOS (24)

1- Vírus	(24)
1.1 - Amostras de Pneumovírus Aviário	(24)
2- Cultivos Celulares	(24)
3- Produção de Antígeno Bruto	(25)
4- Cultivo de Anel de Traquéia	(26)
5- Titulação Viral	(26)
6- Detecção de Anticorpos anti PVA	(27)
6.1 - Teste de Soroneutralização (SN)	(27)
6.2 - ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)	(28)
6.3 - Inoculação Experimental (Estudo in vivo)	(30)
7- Caracterização Viral	(30)
7.1 - Propriedades físico-químicas	(30)
7.1.1- Teste de sensibilidade ao clorofórmio	(31)
7.1.2 -Teste de sensibilidade ao calor	(31)
7.1.3 - Efeito de 5.Iodo-2-Deoxiuridina (IUDR)	(31)
7.1.4 - Teste de sensibilidade ao pH	(32)
7.1.5 - Atividade Hemaglutinante	(32)
7.1.6 - Teste de Hemadsorção	(33)
8 - Determinação da concentração proteica	(33)
9 - Purificação Viral	(33)
10 - Microscopia Eletrônica de Transmissão (contrastação negativa)	(34)
11 - Eletroforese em gel de poliacrilamida – SDS	(34)
12 - Produção de Soros Hiperimunes policlonais	(35)

IV- RESULTADOS (36)

1- Adaptação viral dos isolados de PVA	(36)
1.1 - Células CER (Chicken Embryo Rough)	(36)
1.2 - Células VERO	(38)

1.3 - Cultura de células primárias FEG	(40)
2- Título viral dos isolados	(42)
3- Cultivo em anel de traquéia	(42)
4- Purificação viral	(43)
5- Concentração protéica dos isolados de PVA	(43)
6- Soroneutralização cruzada	(44)
7- Sorologia (ELISA e Teste de Soroneutralização – SN)	(44)
8- Inoculação Experimental	(46)
9- Microscopia Eletrônica	(47)
10 - PAGE-SDS	(48)
11 - Caracterização viral	(49)
V- DISCUSSÃO	(51)
VI – CONCLUSÕES	(55)
VII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	(57)

LISTA DE FIGURAS

	páginas
1- Monocamadas de células CER normais	(37)
2- Monocamadas de células CER com ECP causado por SHSBR-119	(37)
3- Monocamadas de células CER com ECP causado por SHSBR-121	(38)
4- Monocamadas de células VERO normais	(39)
5- Monocamadas de células VERO com ECP causado por SHSBR-119	(39)
6- Monocamadas de células VERO com ECP causado por SHSBR-121	(40)
7- Monocamadas de células primárias FEG	(41)
8- Monocamadas de células primárias FEG com ECP causado por SHSBR-119	(41)
9- Microfotografia eletrônica do PVA	(48)
10- Eletroforese em gel de poliacríamida SDS de amostras de PVA	(49)

LISTAS DE TABELAS

	Páginas
1- Isolamento do PVA em diferentes países	(05)
2- Taxonomia do Paramixovírus	(08)
3- Adaptação viral dos isolados de PVA	(36)
4- Título viral dos isolados de PVA	(42)
5- Cultivo em anel de traquéia	(42)
6- Purificação viral-titulação	(43)
7- Concentração protéica dos isolados de PVA purificados	(43)
8- Soroneutralização cruzada	(44)
9- Análise sorológica de frangos de corte contra PVA	(45)
<hr/>	
10- Análise sorológica de aves matrizes contra PVA	(45)
11- Inoculação experimental com SHSBR-119	(46)
12- Inoculação experimental com STG 75/88	(47)
13- Efeito do pH na replicação viral de SHSBR-119	(50)

I - Introdução

A avicultura brasileira conseguiu em menos de duas décadas situar-se entre os três maiores exportadores de carne de frango. Em 1994, os dados mostraram um crescimento de 10% na produção de carne de frango, ou seja, foram produzidas cerca de 3 milhões e 450 mil toneladas e em 1995 alcançou 3 milhões e 800 mil toneladas. Atualmente, o Brasil ocupa a 2ª posição mundial de produtor e exportador de carne de frango, com uma produção aproximada de 4 milhões e 450 mil toneladas e exportação de 650 mil toneladas. O consumo de carne de frango "per capita" no mercado interno subiu de 17,1 Kg em 1994 para 23,3 Kg em 1997. A produção de ovos, representa 6,2 bilhões de unidades/ano, situando-se o Brasil em 9º lugar na produção mundial segundo os dados da UBA (<http://www.rudah.com.br/uba> 1997).

A Síndrome da Cabeça Inchada (SCI) é uma enfermidade associada a presença do pneumovírus aviário e que afeta matrizes, poedeiras e frangos de corte levando a elevadas perdas econômicas. Em frangos de corte, estas perdas podem chegar a 20%, causando elevada morbidade (100%) e a enfermidade tem curso de duas a três semanas sendo que a mortalidade pode variar entre 1 a 5% quando ocorrem infecções secundárias e de 20 a 30% em condições de contaminações por agentes secundários (Pattison *et al.*, 1989; Gough *et al.*, 1994; Naylor *et al.*, 1997). Em matrizes e poedeiras a doença se manifesta normalmente no início do pico de postura (entre 24 e 52 semanas) levando a uma morbidade e mortalidade relativamente baixas, variando de 3 a 10% e de 1 a 4%, respectivamente. A queda na produção de ovos, fica em torno de 1 a 10% durante 2 a 4 semanas e morte embrionária em incubadoras pode chegar até 10% (O'Brien, 1985; Morley & Thompson, 1984; Bell & Alexander, 1990; Hafez & Loehren, 1990).

Relatos sorológicos sobre a presença de PVA no Brasil foram realizados pela primeira vez por Arns & Hafez (1992) com isolamento do vírus de aves matrizes dos Estados de São Paulo e Minas Gerais (Arns & Hafez, 1995).

Considerando a importante colocação do Brasil no mercado avícola internacional, torna-se relevante importante a realização do estudo comparativo destas amostras isoladas com isolados provenientes de outros países. Dessa forma, tendo-se em vista a escassez de informações relativas ao conhecimento de PVA na avicultura brasileira, empreendeu-se o presente estudo que teve como objetivos:

- estudar a reatividade cruzada de amostras de PVA isoladas no Brasil e em outros países, frente a soros policlonais homólogos e heterólogos através de técnicas de virusneutralização.
 - verificar a presença de efeito ciliostático em cultura de anel traqueal.
 - caracterizar os isolados brasileiros de PVA através de microscopia eletrônica, propriedades físico-químicas e bioquímicas.
 - comparar o perfil eletroforético de dois isolados brasileiros com quatro isolados de PVA de diferentes países europeus através de SDS-PAGE.
-

II- REVISÃO DE LITERATURA

DEFINIÇÃO

O PVA causa a rinotraqueíte em perus e também coriza em galinhas d'Angola. Em associação com outros agentes infecciosos principalmente *Escherichia coli*, produz a Síndrome da Cabeça Inchada (SCI), também conhecida por celulite facial em galinhas (Nunoya *et al.*, 1991; Tanaka *et al.*, 1995) e que afeta frangos de corte de 3 a 6 semanas de idade (Morley & Thompson, 1984), matrizes entre 24 e 36 semanas de idade bem como galinhas poedeiras entre 24 e 36 semanas de idade (Hafez & Lorhen, 1990). Esta doença em galinhas tem sido relacionada também com ao acometimento do sistema respiratório superior, presente na coriza infecciosa, com desenvolvimento subsequente de edema facial e sub-mandibular além de, eventualmente, apresentar otite.

2 – HISTÓRICO

Morley & Thompson (1984) relataram a ocorrência de um surto de doença respiratória na África do Sul, caracterizado pelo aparecimento de aves com as características clínicas de inchaço facial. Este quadro, popularmente conhecido na África do Sul como "DIKKOP" (Cara Inchada) foi denominado pelos autores de "Swollen Head Syndrome -SHS" (Síndrome da Cabeça Inchada) e atribuído a uma infecção por Coronavírus de sorotipo ainda desconhecido e *Escherichia coli*, embora em alguns casos, tenham sido também isolados os vírus da doença de Newcastle e partículas virais semelhantes à Mixovírus. De acordo com os autores, este tipo de problema teria surgido durante a pandemia da Doença de Newcastle, ocorrida de 1971 a 1972 e que, em 1974, mesmo após o controle da Doença de Newcastle, o problema ainda persistia. Como não se conhecia a etiologia da SCI, atribuía-se a ocorrência desse estado mórbido à problemas de má ventilação e poeira ambiental. No início da década de 80, a ocorrência concomitante de um surto de doença respiratória em perus, caracterizada pelo aparecimento de rinotraqueíte e de SCI em galinhas (tanto matrizes reprodutoras como frangos de corte) alojadas próximas às criações de perus, simultaneamente na Inglaterra e na França, levou-se a supor

que tanto a SCI como a rinotraqueíte (TRT-Turkey Rhinotracheitis) possuíam a mesma etiologia (Picault *et al.*, 1987a).

Em 1984, Diaz de Espada & Perona, observaram a sintomatologia da SCI, em frangos de corte na Espanha e concluíram que a patogenicidade do agente isolado em embriões de galinhas SPF (“Specific Pathogen Free”) e sua capacidade hemaglutinante não eram características para o vírus da Bronquite Infecciosa Aviária. Drouin *et al.*, (1985), relataram na França os mesmos sintomas em galinhas e O'Brien e Goren (1985) observaram igual sintomatologia em matrizes na Inglaterra e Noruega.

Mc Dougall & Cook (1986) e Wilding *et al.*, (1986) isolaram em culturas de anéis de traquéia de perus acometidos de TRT, um agente viral semelhante a um Coronavírus ou a um Ortomixovírus e o denominaram de agente ciliostático. Giraud *et al.* (1986b), isolaram na França pelo mesmo sistema, um agente ciliostático que foi adaptado em células Vero (Kidney African Green Monkey) que apresentavam um efeito citopático caracterizado por inclusões eosinofílicas e com semelhança a Mixovírus.

Em 1988, Zellen relatou casos de SCI em frangos de corte no Canadá; Perelman *et al.* em matrizes em Israel e Hafez, em frangos de corte e matrizes, na Alemanha. El Houadfi *et al.* (1991) observaram casos da SCI em frangos de corte em Marrocos; Decanini *et al.*, (1991) em matrizes no México; Arns & Hafez (1992) em frangos de corte, matrizes e poedeiras no Brasil; Lu *et al.*, (1994) em frangos e matrizes, na Tailândia; Tanaka *et al.*, (1995) no Japão e Nagaraja (1997) nos Estados Unidos.

Frente ao exposto e sabendo-se que já em meados de 1980, Buys & Du Preez na África do Sul, teriam isolado um agente ciliostático de perus, Kaleta (1992) discute que provavelmente o agente viral teria sido encontrado originalmente em galinhas d'Angola nativas da África e que teria se adaptado em perus e galinhas. Hoje, as infecções causadas por Pneumovírus tem sido descritas em vários países, tanto em perus como em galinhas (Tabela 1) mas, de acordo com estudos clínicos e sorológicos retroativos, há evidências de que a doença teria aparecido já no final da década de 60; porém, é difícil afirmar

exatamente quando o Pneumovírus foi realmente envolvido no problema visto que o mesmo é de difícil isolamento.

Tabela 1 - Países onde o vírus da SCI foi isolado

PAÍS	AUTOR	ANO
FRANÇA	PICAULT <i>et al.</i>	1987
ESPAÑA	PAGÉS MANTÉ & SAN GABRIEL	1988
ÁFRICA DO SUL	BUYS <i>et al.</i>	1989
HOLANDA	KOUWENHOVEN <i>et al.</i>	1990
REINO UNIDO	JONES <i>et al.</i>	1991
ALEMANHA	HAFEZ <i>et al.</i>	1993
TAIWAN	LU <i>et al.</i>	1994
JAPÃO	TANAKA <i>et al.</i>	1995
BRASIL	ARNS & HAFEZ	1995
USA	NAGAJARA	1998

3 – ETIOLOGIA

3.1- HISTÓRICO

Os primeiros surtos da SCI detectados na África do Sul foram relacionados com a ocorrência de Coronavírus. No momento, sabe-se que a SCI é decorrente de um processo de infecção primária por Pneumovírus associado com infecção secundária com *E. coli* e/ou outros agentes infecciosos virais ou bacterianos e/ou fatores ambientais (Diaz de Espada & Perona, 1984; Morley & Thomson, 1984).

As pesquisas realizadas nos anos subsequentes não levaram ao conhecimento de um agente específico responsável pela doença. Sabe-se que regularmente ocorre *E. coli* no isolado, porque esta bactéria tem um papel especial, quando ocorre como agente secundário (Pages Mante, 1984; O'Brien, 1985). Embora o comportamento da rinotraqueíte dos perus e a síndrome da cabeça inchada em galinhas apresentem um desenvolvimento paralelo evidente, não havia conhecimento de relação entre as duas formas da doença (O'Brien, 1985).

Após o isolamento do PVA em perus (Cook & Mc Dougall, 1986; Giraud *et al.*, 1986 a,b; Wilding *et al.*, 1986) e provas sorológicas dos anticorpos contra o vírus TRT em galinhas (Wyeth *et al.*, 1987) foi finalmente comprovada uma ligação entre estes dois vírus. Picault *et al.*, (1987) isolaram um vírus parecido com PVA de órgãos respiratórios de galinhas que adoeceram com SCI. Perus e pintos SPF foram inoculados com homogeneizado de tecido do trato respiratório demonstrando sinais clínicos, com uma rinotraqueíte típica em perus e sintomatologia branda em pintos. Além disso, reisolou-se o vírus inoculado em animais infectados experimentalmente. Resultados comparáveis foram observados também após infecção experimental de galinhas d'Angola.

Buys *et al.*, (1989 a) isolaram um vírus em frangos com sintomas da SCI na África do Sul. O vírus, designado 2381/88, mostrou ter afinidade com o vírus TRT de perus e os autores observaram sintomas respiratórios semelhantes após infecção experimental em pintos. Os pintos imunizados com isolado de peru 91/78 não apresentaram nenhum sintoma clínico após infecção com o patógeno isolado de galinhas. Os autores, baseando-se nestas observações, concluíram que o vírus isolado de galinhas (amostra 2381/88) seria uma subpopulação do vírus TRT adaptada em galinhas.

Tanaka *et al.*, (1996) relataram a detecção sorológica do PVA em lotes de frangos de corte (matrizes). Os soros coletados num período de dez anos mostraram presença de anticorpos só a a partir de 1988, indicando a possível entrada de vírus neste período no Japão. Observaram, ainda, que os índices de soros positivos aumentaram a cada ano, comprovando a disseminação do vírus por todo o país.

3.2 – CLASSIFICAÇÃO

Acreditou-se inicialmente que o vírus TRT de perus se tratava de um Coronavírus (Morley & Thomson, 1984) mesmo apresentando semelhanças com Ortomixovírus (Mc Dougall & Cook, 1986). Outros autores classificaram-no como semelhante a Mixovírus (Giraud *et al.*, 1986b) ou Pseudomixovírus (Giraud *et al.*, 1988). O tamanho, as características morfológicas, físicas, químicas e sorológicas levam à conclusão

que o vírus TRT se classifica na família Paramyxoviridae, gênero Pneumovirus (Collins & Gough, 1988; Giraud *et al.*, 1988; Alexander 1990). Collins *et al.*, em 1986, compararam o perfil eletroforético do TRT-vírus em PAGE-SDS com Paramixovirus 1 e 3, dois Coronavírus aviários, Ortomixovirus e vírus respiratório sincicial bovino. As bandas observadas no TRT-vírus se diferenciaram claramente dos outros vírus pertencentes a outros gêneros e famílias, porém foram observadas semelhanças com o vírus sincicial bovino. O perfil eletroforético do PVA se diferenciou claramente dos outros isolados pertencentes aos gêneros e famílias, observando-se semelhanças somente com o vírus sincicial bovino.

Collins & Gough (1988) compararam através de PAGE-SDS o perfil eletroforético do PVA com os Pneumovirus de bovinos, humano, camundongo e um Paramixovirus aviário (Vírus da Doença de Newcastle, cepa Ulster 2C). Os autores observaram que duas proteínas do isolado PVA se mostraram análogas às do Pneumovirus e bem distintas das proteínas do vírus da doença de Newcastle.

3.3 - TAXONOMIA DO PARAMIXOVIRUS

Tabela 2: Taxonomia do Paramixovirus

Subfamília	Gênero	Espécies	Hospedeiro
Paramyxovirinae	<i>Paramyovirus</i>	Parainfluenza humana tipo 1-3	Homem
		Parainfluenza bovinos	Boi
		Vírus Sendai	Rato
	<i>Morbilivirus</i>	Sarampo	Homem
		Cinomose	Cão
		Cinomose	Golfinho
		Cinomose	Foca
		Peste bovina	Boi
	<i>Rubulavirus</i>	Caxumba	Humanos
		Newcastle (Paramixovírus tipo 1)	Aves
		Paramixovírus aviário 2-9	Aves
		Parainfluenza humana 2, 4a, 4b	Homem
		Rubulavírus suíno (La-piedad-Michoacan)	Porco
		Parainfluenza de primatas tipo 5-41	Macaco
Pneumovirinae	<i>Pneumovirus</i>	VRS (vírus respiratório sincicial humano)	Homem
		VRSB (vírus respiratório sincicial bovino)	Boi
		VPC (vírus da pneumonia de camundongos)	Camundongos
		PVA (pneumovírus aviário)	Galinhas e Perus

Fonte: ICTV: International Committee on the Taxonomy of Viruses

3.4 - PROPRIEDADES ESTRUTURAIS DOS PARAMIXOVIRUS

Os vírus são pleomórficos, usualmente esféricos, com diâmetro aproximado de 150 nm, sendo comuns as formas filamentosas. O envelope é derivado da membrana lipídica celular, incorporando 2 ou 3 glicoproteínas virais e 1 ou 2 proteínas não glicosiladas. As projeções na superfície da célula medem 8 - 12 nm de comprimento, distantes entre si de 7 a 10 nm de acordo com o gênero. O nucleocapsídeo tem simetria helicoidal e mede 13 - 18 nm de diâmetro.

Os vírus são sensíveis a solventes lipídicos, detergentes não iônicos, formaldeído e agentes oxidantes. O ácido nucleico genômico é uma molécula única de RNA ss, peso molecular de $5-7 \times 10^6$, cerca de 0,5% do peso da partícula viral. As proteínas comuns a todos os gêneros são: 3 proteínas associadas ao nucleocapsídeo denominadas proteínas de ligação a RNA (N ou NP), fosfoproteína (P) e uma polimerase. O envelope contém uma proteína matriz não glicosilada (M) e duas proteínas glicosiladas compreendendo a proteína de fusão (F) e a proteína de fixação (G,H ou HN). As proteínas variáveis incluem as proteínas não estruturais (C,1C/NS1 e 1B/NS₂0), uma proteína de membrana integral pequena (SH/1A), uma segunda proteína não glicosilada no interior do envelope (M2 /22 Kda) e uma proteína rica em cisteína (V).

As enzimas variavelmente representadas e relatadas entre gêneros são: transcriptase, poliadenilato transferase, metil transferase RNAm e neuraminidase. Os lipídeos representam cerca de 20 - 25% do peso e são derivados da célula hospedeira. Os carboidratos representam 6% do peso e sua composição depende da célula hospedeira (Calnek, 1995).

3.5 - PROPRIEDADES DO PNEUMOVÍRUS AVIÁRIO (PVA)

O pneumovírus aviário (PVA) apresenta pleomorfismo acentuado e projeções de 13 a 14 nm, distribuídas uniformemente na superfície. As formas esféricas apresentam diâmetro de 80 a 200 nm, enquanto que as filamentosas apresentam 1 a 2 μm ou mais de

comprimento. O nucleocapsídeo é helicoidal com diâmetro de 13 a 14 nm e peso molecular de $5-7 \times 10^6$. O PVA apresenta uma densidade de 1,20 a 1,22g/ml em gradiente de sacarose (Collins & Gough, 1988; Giraud *et al.*, 1986b; Picault *et al.*, 1987; Alexander, 1993; Cook, 1993).

O PVA apresenta atividade hemaglutinante e neuramínica negativas não aglutinando eritrócitos de aves ou de mamíferos. São vírus RNA de fita simples, não segmentada de sentido negativo, com 15 a 16 Kb, contendo seis ou mais genes que codificam a fosfoproteína P (35-40 KDa) e uma proteína L (200 KDa) com função de polimerase. Ambas proteínas são necessárias ao processo de transmissão e replicação, estando associadas à nucleoproteína N (38-43 KDa) do vírus. São codificadas também proteína G (82-84 KDa), proteína glicosilada responsável pela ligação do vírus à célula do hospedeiro, proteína F (68 KDa) responsável pela fusão, proteína matriz M (30-35 KDa) e um polipeptídeo não identificado de 19-22 KDa. (Collins & Gough, 1988; Ling & Pringle, 1988; Gough & Collins, 1989; Fenner, 1993).

O vírus é sensível ao clorofórmio e éter, podendo ser inativado pelo calor à temperatura de 56°C ou 60°C por 30 minutos (Collins *et al.*, 1986; Mc Dougall & Cook, 1986; Collins & Gough, 1988; Buys *et al.*, 1989 a; Hafez & Weiland, 1990; Hafez, 1992). Apresenta-se bastante sensível em relação a agentes desinfectantes. Assim, Lysovet-PA, Venovet-1 e H₂O₂ em concentração de 0,5 % podem inativá-lo completamente em 15 minutos (Hafez & Arns, 1991). É estável a intervalos de pH entre 3,0 e 9,0 (Giraud *et al.*, 1988; Arns & Hafez, 1992).

Gough & Collins (1989) detectaram por PAGE-SDS em culturas infectadas sete polipeptídeos com pesos moleculares de 200, 84, 54, 42, 37, 31 e 14 KDa, sendo que os polipeptídeos de 54 e 84 KDa mostraram ser de natureza glicosilada. Gough *et al.*, (1994) demonstraram através de PAGE-SDS que a estrutura molecular do vírus isolado era similar à estrutura do vírus CVL 14/1, cujas proteínas já eram conhecidas.

3.6 DIVERSIDADE ANTIGÊNICA

Os testes de soroneutralização utilizando-se antissoro policlonal e precipitação em gel de ágar não mostraram nenhuma diferença entre as amostras isoladas nos diferentes países (Baxter Jones *et al.*, 1987), sugerindo a existência de um único sorotipo do vírus. Gough & Collins (1989) compararam 3 isolados de PVA através de microscopia eletrônica, neutralização cruzada, imunodifusão dupla e eletroforese em gel de poliacrilamida - SDS. Os autores observaram que os 3 isolados apresentaram morfologia e antigenicidade similares. O'Loan *et al.*, (1992) analisaram cinco amostras virais isoladas na França, Grã-Bretanha e África do Sul por técnicas de imunofluorescência e microscopia eletrônica e comprovaram os resultados anteriores. Trabalhos posteriores comparando cepas virais de vários países demonstraram alguma diversidade (Hafez, 1992; Collins *et al.*, 1993; Cook *et al.*, 1993 b), embora fosse considerado até então que todas as cepas pertencessem a um sorotipo.

Hafez (1994) demonstrou similaridade entre cepas alemãs e inglesas em relação à cepa francesa, através dos testes de neutralização cruzada e PAGE-SDS. Utilizando-se de teste ELISA o autor constatou que os soros provenientes da França só apresentaram resultados positivos com antígeno homólogo, enquanto que os soros provenientes da Alemanha e Inglaterra apresentaram reação positiva também com antígenos heterólogos.

Entretanto, as provas realizadas com anticorpos monoclonais (Mabs) e, posteriormente, métodos moleculares revelaram diferenças indicando que os isolados de PVA pertenciam a dois sub-grupos (Naylor *et al.*, 1997). Cook *et al.*, (1993 a) observaram que o vírus isolado na África do Sul em 1978 e outro isolado na Inglaterra em 1985 eram muito mais relacionados do que os vírus isolados na Inglaterra e na França entre pequenos intervalos de tempo. Collins *et al.*, (1993) usando um perfil diferente de anticorpo monoclonal, observaram que os 3 isolados da Inglaterra estavam muito mais relacionados entre si do que com as cepas isoladas na Itália, Hungria e Espanha.

Naylor *et al* (1997) relataram que os surtos oriundos na Grã-Bretanha entre 1994 e 1995 estavam associados com um PVA pertencente ao sorotipo B. No período de 1985 a 1995 as cepas de PVA encontradas na Inglaterra e Europa tinham características antigênicas similares ao vírus dos sorotipos A e B.

A base molecular para diferenças entre as cepas virais foi confirmada por Juhasz & Easton (1994) que compararam a seqüência de nucleotídios da proteína de ligação (G) provenientes de isolados de cinco continentes diferentes e com a variante local do isolado previamente estudado na Inglaterra. A seqüência nucleotídica indicou pelo menos 2 grupos distintos, análogos ao grupo descrito para Vírus Respiratório Sincicial. Os isolados da Inglaterra e França formaram um sub-grupo enquanto que os isolados da Espanha, Itália e Hungria formaram um segundo sub-grupo.

Esta demonstração de diferentes subtipos é o avanço mais importante na pesquisa de PVA. Embora as diferenças encontradas sejam na proteína G, a qual está intimamente envolvida nos estágios iniciais da infecção, há implicação óbvia para a proteção pelas vacinas e diagnóstico sorológico usando vírus específicos como antígenos de referência em método de ELISA e soroneutralização cruzada. A demonstração de que existe uma diversidade de antígenos entre os diferentes isolados dos vírus tem implicações importantes para o diagnóstico sorológico (Toquin *et al.*, 1996). Além disso, o conhecimento mais profundo da estrutura molecular pode aumentar o entendimento da disseminação regional e global do Pneumovírus.

O PVA infecta principalmente perus, matrizes e frangos de corte, sendo as poedeiras também susceptíveis (O'Brien, 1985; Picault *et al.*, 1987; Buys *et al.*, 1989a). Os vírus isolados de perus e galinhas podem infectar ambas espécies, sendo a diferença que os vírus isolados de galinhas provocam a doença clínica em perus e galinhas e os vírus isolados em perus não são capazes de induzir sinais clínicos característicos em galinhas (Buys *et al.*, 1989b).

3.7 - MULTIPLICAÇÃO VIRAL

A etapa inicial é a adsorção do vírus nos receptores da célula. A fusão das membranas viral e celular é causada pela ação da proteína F e então o complexo nucleocapsídeo entra na célula.

A replicação intracelular do vírus tem lugar inteiramente dentro do citoplasma e como o vírus RNA tem sentido negativo, é necessário o RNA viral direcionar a RNA polimerase (transcriptase) para produzir fita complementar de sentido positivo que atua como RNA mensageiro e utilizar os mecanismos celulares que capacitam a tradução em proteínas virais. A proteína F é sintetizada como precursor não funcional, FO, o qual requer quebra a F1 e F2 por proteínas do hospedeiro. As proteínas virais sintetizadas na célula infectada são transportadas para a membrana celular, a qual se torna modificada por sua incorporação. Depois de um alinhamento do nucleocapsídeo próximo às regiões modificadas da membrana celular, as partículas virais são liberadas da superfície celular (Calnek, 1995).

3.8 - PATOGENIA

A patogenia viral refere-se a interação de fatores do vírus e hospedeiro que levam à produção da enfermidade. As primeiras portas de entrada do vírus são as membranas que recobrem o trato respiratório. A transmissão é geralmente associada ao contato íntimo com estas superfícies bem como fatores ambientais favoráveis. Assim, em condições de baixa umidade bem como má ventilação, calor intenso, poeira e clima seco, a disseminação da doença entre galinhas criadas em cama é rápida (cerca de 24 horas). No caso de aves criadas em gaiolas, em boxes ou galpões separados, a transmissão da doença é relativamente lenta (cerca de 1 a 2 semanas) podendo até mesmo não ocorrer.

Segundo Jones *et al.*, (1988) e Giraud *et al.*, (1986a, b) a replicação ocorre no citoplasma das células epiteliais ciliadas que revestem a mucosa dos condutos nasais, da laringe e da traquéia de perus, galinhas e galinhas d'Angola. Com a infecção, as células

perdem a atividade ciliar, sendo que em perus pode-se observar inclusão citoplasmática eosinofílica.

Jones *et al.*, (1988) observaram que o vírus provavelmente está presente no trato respiratório 4 a 6 dias antes do aparecimento dos sinais clínicos. O vírus replica no epitélio ciliado do trato reprodutivo da mesma maneira como ocorre no trato respiratório. O vírus alcança o oviduto através da corrente circulatória após a replicação primária no trato respiratório (Jones *et al.*, 1988). Os sinais clínicos provavelmente são reflexos do dano provocado pela multiplicação do vírus no epitélio ciliado, tanto na traquéia como no trato reprodutivo (Williams *et al.*, 1991a).

Considerando-se que a multiplicação viral é lenta mas ocorre nas células epiteliais de anéis de traquéia cultivadas *in vitro*, pode-se supor que a maioria das infecções *in vivo* sejam assintomáticas ou restritas ao aparecimento de sintomas leves (aumento de secreções e espirros devido a um processo de hiperplasia glândular) visto que em condições normais há uma reposição eficiente das células que revestem as mucosas. Por esta razão, que anticorpos contra Pneumovírus têm sido detectados em aves clinicamente saudáveis. Assim, fatores que comprometem a habilidade de reparação epitelial, que contribuem para um aumento da atividade secretória, que deprimem as defesas locais ou o sistema BALT (tecido linfóide associado ao brônquio) como o stress, poeira, concentração de gases ambientais, doenças intercorrentes respiratórias e imunodepressoras contribuem para a instalação de agentes secundários, principalmente *E. coli*. Isto leva a um processo inflamatório intenso, principalmente a nível de condutores naso-lacrimais, onde observa-se a presença de secreção muco-catarral, lacrimejamento e blefarite. A persistência de colonização bacteriana leva ao acometimento do tecido subcutâneo da região submandibular do tecido ósseo do crânio e ao final, à afecção das meninges, que é a fase que caracteriza a SCI (Alexander, 1991; Naylor & Jones, 1994).

A transmissão ocorre de forma horizontal por via aérea, através do contato de aves doentes e saudáveis. A transmissão vertical ainda não foi observada, sabendo-se somente da passagem de anticorpos maternos para os pintinhos (Giraud *et al.*, 1986b). Williams *et*

al., (1991), demonstraram que o vírus pode se disseminar de aves inoculadas experimentalmente para aves susceptíveis, mantidas em contato, a partir de 5 dias após a inoculação. Stuart (1989) sugere a transmissão através de aves silvestres migratórias como uma possível fonte de transmissão do vírus na Europa.

3.9 - EPIZOOTIOLOGIA

A origem do PVA ainda é obscura, embora os primeiros relatos da doença em perus tenham sido descritos na África do Sul (Buys *et al.*, 1989b). Assim, estes dados são sugestivos de que o Pneumovírus possa ser um patógeno natural de aves nativas silvestres na África do Sul. Em 1994, Cadman *et al.*, relataram a detecção por ELISA de anticorpo TRT no soro de avestruz em Zimbabwe, embora o vírus não tenha sido isolado deste animal.

Além disso, não se sabe como o vírus se disseminou entre os diferentes continentes, deixando amplas superfícies terrestres sem infecção. Além da África e Europa, foram isolados Pneumovírus e observada a soroconversão na Ásia (Lu *et al.*, 1994), América Central e América do Sul (R.C.Jones, observações não publicadas). O vírus está atualmente presente na maioria das áreas do mundo onde perus são mantidos comercialmente e em vários países com poucos ou até mesmo sem perus. Jones (1996) relatou que o vírus foi pela primeira vez observado na Irlanda do Norte, que até então estava livre, apesar da presença de infecção no continente britânico já há 10 anos.

Quando a doença surgiu pela primeira vez na Grã Bretanha, o vírus TRT foi observado no Condado de Kent, a região mais oriental e ligada ao continente europeu. A análise de anticorpos monoclonais por Cook *et al.*, (1993a, b), mostraram que o isolado de 1978 da África do Sul e o da Inglaterra em 1985 estavam mais relacionados do que os isolados obtidos da mesma época da Inglaterra e França. Isto aumenta ainda mais a possibilidade de que aves migratórias possam ser importantes na transmissão do vírus.

3.10 - SINAIS CLÍNICOS, MORBIDADE, MORTALIDADE

Os sinais clínicos de SCI em criações de frangos foram descritos por O'Brien (1985) como inchaço das sinusites periorbital e infraorbital, torcicolo, desorientação cerebral e depressão. Em geral menos de 4% do plantel é afetado, embora em algumas ocasiões só tenham sido observados sintomas respiratórios. A queda na produção de ovos também tem sido associada com a SCI. As aves mais susceptíveis são perus jovens e matrizes pesadas, principalmente na primeira semana de produção, seguido de frangos de corte e poedeiras (Avellaneda & Villegas, 1993; Hafez, 1992).

O curso da doença varia de 5 a 10 dias sendo no máximo de 6 semanas, com morbidade variável de 1-90%. A mortalidade bem como a morbidade variam de acordo com o tipo de agente secundário, tipo de criação e das condições ambientais. No caso de frangos de corte, dependendo do agente secundário, a mortalidade pode atingir 20% do plantel. Já entre matrizes, a mortalidade varia de 1-5% e se restringe àquelas que apresentam a cara inchada.

Do ponto de vista clínico, a doença pode se manifestar sob as formas aguda e subaguda acometendo normalmente o trato respiratório superior, principalmente os cornetos nasais e traquéia (Jones *et al.*, 1988 e Heckert *et al.*, 1994). Na forma aguda, que apresenta maior incidência entre as matrizes, as aves apresentam na fase inicial uma prostração profunda, aspecto comatoso ou estado de apatia (as aves ficam paradas durante 3-5 horas sem ingerir alimentos ou água) vindo ao óbito por inanição ou desidratação. As vezes, além destes sintomas, apresentam torcicolo ou opistótono, incoordenação motora e perda do equilíbrio. As aves infectadas apresentam sempre uma degeneração evidente dos folículos ovarianos mais desenvolvidos e dos óvulos maduros. Na forma subaguda, as aves apresentam na fase inicial edema uni - ou bilateral das pálpebras. À medida que a blefarite se acentua e o processo evolui para uma inflamação purulenta, as aves apresentam conjuntivite com lacrimajamento intenso. Nesta forma clínica, eventualmente observa-se edema submandibular e/ou sublingual, corrimento nasal e otite (Wyeth *et al.*, 1987; Hafez, 1992 e Gough *et al.*, 1994).

3.11 - SINTOMATOLOGIA

O decurso da doença (sintomas, duração e mortalidade) é muito variável e depende de vários fatores: tipo de exploração, idade, infecção bacteriana secundária, outras infecções virais, período da vacinação de bronquite infecciosa e doença de Newcastle (El Houadfi *et al.*, 1991), má ventilação bem como contaminação da atmosfera, poeira, alta densidade populacional e falta de higiene (Morley & Thomson, 1984; Hafez, 1992; Cook, 1997).

Os primeiros sintomas que levam a suspeitar de SCI são: corrimento nasal, tosse ou espirros discretos, tumefação periorcular, aumento significativo e repentino da mortalidade assim como diminuição do apetite (Tanaka *et al.*, 1995).

3.12 - ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS

A microscopia mostra inicialmente um achatamento do epitélio respiratório com diminuição da atividade ciliar e finalmente progressiva perda dos cílios, congestionamento subepitelial e hiperplasia das células epiteliais (Morley & Thomson, 1984). Nas células ciliadas são observados corpúsculos citoplasmáticos acidófilos (Picault *et al.*, 1987). Frequentemente são observados celulite, periostite e osteomielite dos ossos da cabeça. Em muitos casos ocorre também otite externa e interna além de meningite (Pattison *et al.*, 1989).

No cérebro observa-se gliose com hiperemia, concentração perivascular de leucócitos e em menor grau sangramento. Alterações degenerativas podem ser observadas somente nas células purkinje do cerebelo. Como outros achados patológicos foram observados hiperemia renal e glomerulonefrite (San Gabriel, 1984).

3.13 - IMUNOLOGIA

Tanto infecções experimentais como infecções de campo levam à formação de anticorpos 3 semanas após a infecção. A presença destes anticorpos pode ser demonstrada por reação imunoenzimática (ELISA). Os anticorpos neutralizantes alcançam seu nível máximo em 5 a 6 semanas pós infecção (Goater, 1993).

Podem ser encontrados anticorpos no soro de frangos de corte, matrizes e poedeiras com ou sem sinais de SCI, não havendo correlação entre a presença de anticorpos e a doença clínica, mas sim com a infecção (Cook *et al.*, 1988; Hafez & Lohren 1990; Wyeth *et al.*, 1987).

A exposição do trato respiratório a patógenos resulta na produção de anticorpos locais das classes IgM e IgG que são responsáveis pela neutralização do agente. Os anticorpos podem ser detectados a partir de 5 dias após o aparecimento dos sinais clínicos, através de reação imunoenzimática (ELISA), soroneutralização (SN) e imunofluorescência indireta (IFI) (Baxter; Jones *et al.*, 1986). A ativação do sistema imune local e a produção de anticorpos circulantes são mecanismos importantes para a proteção após o desafio viral, mas a imunidade celular apresenta uma importância maior na defesa contra o PVA (Williams *et al.*, 1991; Jones *et al.*, 1992; Sharma 1994; Majó *et al.*, 1996).

3.14 - DIAGNÓSTICO

Os sinais clínicos da infecção por Pneumovírus em perus e galinhas não são patognomônicos de modo que é necessário recorrer a métodos laboratoriais para o diagnóstico (Alexander, 1991).

A confirmação da infecção por PVA depende da demonstração do vírus no material clínico ou de anticorpos vírus-específico no soro. Em geral, o vírus tem sido muito mais difícil de ser isolado em frangos do que em perus e sugere-se que isto se deve ao curto tempo de replicação do agente no tecido alvo, não estando mais presente quando do

aparecimento dos sinais clínicos mais evidentes (Cook *et al.*, 1991, Lu *et al.*, 1994 e Otsuki *et al.*, 1996).

Para o isolamento, as amostras devem ser coletadas do trato respiratório superior durante os quatro primeiros dias de infecção. Em geral, as amostras são coletadas da traquéia ou cornetos nasais, secreções nasal e ocular e de homogeneizados de traquéia ou pulmão, quer seja na forma de “swabs” ou tecido, que são então inoculados em sistemas sensíveis (Cook *et al.*, 1991; McDougall & Cook, 1986; Wyeth *et al.*, 1986 e Tanaka *et al.*, 1995)

Entretanto, o sistema de isolamento recomendado é a cultura de anéis de traquéia de perus ou embriões de galinha SPF McDougall & Cook (1986). Neste sistema, o vírus induz a ciliostase pelo menos num período de 4 a 5 dias pós infecção e requer pelo menos seis passagens para obtenção de um baixo título infectante (Hafez, 1992 e Naylor & Jones, 1994).

Para obtenção de um título maior para fins de identificação e caracterização biológica, há necessidade de adaptação do vírus através de passagens subseqüentes no sistema acima mencionado ou em células VERO (Buys *et al.*, 1989a), BSC-1 (D' Aprile, 1989a) ou CER (Hafez & Weiland, 1990; Shakal & Koch, 1995). Após mais passagens, observa-se o efeito citopático cerca de 3 a 5 dias após a infecção de cultura de células.

O vírus pode ser isolado também através de inoculação em ovos embrionados de galinhas, via cavidade alantóide (Jones *et al.*, 1986) e após 3 a 5 passagens cegas observa-se a mortalidade embrionária causada pelo mesmo (Alexander, 1991).

Giraud *et al.*, Wyeth *et al.*, e Jones *et al.*, (1988) isolaram o vírus através da inoculação do mesmo em saco vitelínico de ovos, sendo que este causou a morte dos ovos embrionados entre 7 e 14 dias. Gough *et al.*, (1994) isolaram o vírus de frangos de corte por inoculação de exsudato de traquéia e cornetos nasais na cavidade alantóide e saco vitelínico de ovos embrionados SPF, resultando na morte de embriões entre 6 a 11 dias após a

inoculação. Tanaka *et al.*, (1995) isolaram o vírus após inoculação na membrana córion alantóide de ovos embrionados.

Para a identificação da presença do vírus ou de anticorpos são utilizados o teste de imunofluorescência indireta, imunofluorescência direta, imunoperoxidase, imunogold, imunocitoquímica, microscopia eletrônica, soroneutralização (Baxter & Jones *et al.*, 1986; Jones *et al.*, 1988; Majó *et al.*, 1994; O'Loan & Allan, 1990; Majó *et al.*, 1995; O'loan & Allan, 1992; Majó *et al.*, 1996; Collins *et al.*, 1986; Gough & Collins, 1986; Cook *et al.*, 1988; Otsuka *et al.*, 1996; Giraud *et al.*, 1988; Wyeth *et al.*, 1987 e Cook, 1997).

A nível molecular têm sido utilizadas técnicas como PCR que apresenta a vantagem de detectar pequenas quantidades de vírus sem a necessidade de outros testes confirmatórios e de testes preliminares. Por ser altamente específica, a PCR não é afetada pela presença de outros patógenos tornando-se importante na caracterização do isolado viral do ponto de vista genético e em estudos epidemiológicos (Cavanagh *et al.*, 1993).

Em relação a “nested” RT-PCR, já foram descritas duas metodologias para detecção de PVA através de amplificação de fragmentos da glicoproteína F (Jing *et al.*, 1993 e Mase *et al.*, 1996). Trabalhos mais recentes realizados no Brasil por Dani *et al.*, (1999) incluem o uso de sondas quimioluminescentes, que possuem vantagens por apresentar menor risco de contaminação comparada as metodologias clássicas de “nested” PCR. Além disso, foram caracterizados a nível genético-molecular os dois isolados brasileiros de PVA através de análise com enzimas de restrição e sequenciamento automático (Dani *et al.*, 1998).

3.15 - SOROLOGIA

Anticorpos anti pneumovírus aviário podem ser detectados em testes padrão de soroneutralização em cultura de órgão (Baxter & Jones *et al.*, 1987) ou culturas primárias de fibroblasto de embrião de galinha apresentando resultados muito similares àqueles do teste de ELISA (Gough & Collins, 1989).

O método mais frequentemente utilizado para detectar-se anticorpos específicos para PVA tem sido o método de ELISA, que oferece resultados confiáveis e comparáveis ao de outros testes, além de ser um teste de execução mais fácil e indicado para grande número de amostras. O método de ELISA é mais sensível que os testes de hemaglutinação e imunodifusão, em muitos casos, de sensibilidade comparável ao teste de soroneutralização (Baxter Jones *et al.*, 1987; Grant *et al.*, 1987; Gerrard *et al.*, 1990; Tanaka *et al.*, 1996).

Cook *et al.*, (1988) observaram correlação entre resultados obtidos nos testes de soroneutralização e ELISA em frangos de corte infectados naturalmente. Os anticorpos foram detectados em soro de lotes demonstrando sinais clínicos de SCI, com queda na produção de ovos e em lotes aparentemente saudáveis, indicando que a infecção pelo PVA não leva necessariamente ao aparecimento clínico da doença. Collins *et al.*, (1993) utilizaram soroneutralização e ELISA na comparação de reação de soros policlonais de galinhas contra diferentes vírus e em relação a anticorpos monoclonais contra dois vírus isolados na Inglaterra. O método de ELISA demonstrou que os sete vírus testados eram antigenicamente relacionados utilizando soros policlonais, resultados estes demonstrados também pelo teste de soroneutralização. Houve evidências de que três isolados na Inglaterra apresentaram maior afinidade entre si do que os vírus isolados em outros locais.

Segundo Cook (1997) o método de ELISA é um dos melhores métodos sorológicos, principalmente quando se utiliza soros pareados, coletados no momento da observação dos sinais clínicos e algumas semanas após a recuperação das aves.

Estudos tem demonstrado que as cepas isoladas na França são antigenicamente semelhantes (Cook *et al.*, 1993 b) e diferem de cepas isoladas no Reino Unido (Hafez, 1991 e Eterradosi *et al.*, 1992) por método de ELISA utilizando-se soros policlonais ou soroneutralizadores com anticorpos monoclonais (Cook *et al.*, 1993 a,b).

3.16-ESCOLHA E TEMPO DAS AMOSTRAS PARA O ISOLAMENTO

Embora o vírus tenha sido isolado de traquéia, pulmão e vísceras de aves afetadas, a fonte mais abundante de vírus tem sido as secreções nasais ou raspado de tecido dos seios nasais de aves afetadas. É muito importante a obtenção das amostras o mais rápido possível após a infecção. O isolamento do vírus raramente é bem sucedido em aves mostrando sinais severos; talvez, estes sinais extremos sejam resultados de uma infecção advinda de bactérias em aves predispostas por infecções virais anteriores causando provavelmente o insucesso no isolamento do vírus SCI em frangos (Calnek, 1995).

3.17 - TÉCNICAS DE ISOLAMENTO

Suspensões 20% (v/v) de secreção/exsudato nasal e material dos sinos em tampão fosfato salina (PBS) contendo antibióticos são mantidas a temperatura ambiente por 1-2 horas, clarificadas por centrifugação a 1.000g durante 10 minutos e então passadas através de membranas com filtro de porosidade de 450µm. Ovos embrionados de frango SPF (livre de patógeno específico) com 6 a 7 dias de idade podem ser inoculados via saco alantóide. Cultura de anéis de traquéias de embrião de galinhas ou pintos são susceptíveis à infecção, mas as de perus são geralmente mais sensíveis e podem ser usadas desde que sejam de plantéis SPF ou pelo menos de plantéis livres de anticorpos específicos. Passagens cegas devem ser feitas usando fluido amniótico- alantoidiano armazenados 10 dias depois da inoculação ou o sobrenadante de cultura de anéis de traquéia 7 dias após a inoculação. Na passagem em ovos, o vírus impede inicialmente o crescimento do embrião e após 4-5 passagens causa a morte. Em cultura de órgãos, o vírus pode causar ciliostase em 2 a 3 passagens. Os vírus adaptados para que sejam letais em embriões ou causar rápida ciliostase geralmente crescem em títulos muito baixos. Nesta fase eles são geralmente capazes de crescer em culturas de fibroblastos de galinha (FEG) embora a produção de ECP completo possa requerer mais passagens em células FEG. Os vírus adaptados em culturas FEG alcançam títulos altos, sendo possível confirmar a identidade do vírus por microscopia eletrônica e teste de soroneutralização. Como alternativa, os testes de soroneutralização

para diagnóstico confirmatório pode ser dado em cultura de anéis de traquéia, observando-se a inibição de ciliostase por antissoro específico (Calnek, 1995).

III- MATERIAL E MÉTODOS

1 – VÍRUS

1.1 - AMOSTRAS DE PNEUMOVÍRUS AVIÁRIO

Foram utilizadas as seguintes amostras: SHS BR-119 - isolada de aves matrizes com SCI após 16 passagens em células CER, previamente adaptada em cultura de anel de traquéia, proveniente do Laboratório de Virologia, Departamento de Microbiologia, Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas (SP), Brasil, Arns & Hafez (1995); SHS BR-121 - isolada de aves matrizes com SCI após passagens em células FEG (fibroblasto de embrião de galinha SPF), mais cultura de anel de traquéia, com passagens sucessivas, proveniente do Laboratório de Virologia, Departamento de Microbiologia, Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas (SP), Brasil, Arns & Hafez (1995); STG-761/88 - isolada de perus com sintomas de rinotraqueíte, após 16 passagens em células CER, no Laboratório Estadual de Stuttgart; Alemanha; BUT1=8544- isolada de perus em cultura de anel de traquéia em embrião de peru SPF e adaptada em cultura primária de embrião de galinha SPF, após várias passagens, proveniente da British United Turkeys Ltda (BUT), Chester, Inglaterra; CVO₃ - isolada de perus com SCI, após 28 passagens em células VERO, proveniente do Laboratório "RHONE MERIEUX ", Lyon, França e STG-IS₂/91 - isolada de galinhas com SCI, após 11 passagens em células CER, proveniente do Laboratório Estadual de Stuttgart; Alemanha após adaptação em culturas de células CER, segundo Williams *et al.*, (1991).

2 - CULTIVOS CELULARES

Para o cultivo celular, foram utilizadas linhagens contínuas de células CER (Chicken Embryo Rough), doada pelo Prof. Dr. H.M.Hafez, do Laboratório Estadual de Stuttgart (Alemanha), originada de célula primária de embrião de galinha com célula renal de hamster (Smith *et al.*, 1977).

As células foram cultivadas em garrafas de 75 cm² (Corning) com concentração inicial de 2x10⁵ células/ml em meio mínimo essencial EAGLE (MMEE-Cultilab) acrescido de 10% de soro fetal bovino (Sigma Chemical Company) durante 48 horas a 37°C.

3 - PRODUÇÃO DE ANTÍGENO BRUTO

Para a produção de antígeno bruto foram cultivadas monocamadas de células conforme mencionado no item 2 e em seguida infectadas com as amostras virais (item1). As culturas celulares foram incubadas durante 48 horas a 37°C e a seguir, o meio de crescimento celular foi eliminado. As células foram lavadas com meio EAGLE e em seguida inoculado 0,01 a 0,1 DICT₅₀/ml de amostras de TRT-vírus e PVA.

Após 2 horas de adsorção viral a 37°C, o inóculo foi eliminado, as monocamadas lavadas com PBS (NaCl 8g; KCl 0,2 g; Na₂HPO₄ 12g; H₂O 2,9 g; KH₂PO₄ 0,2g ,H₂O desmineralizada bidestilada q.s.p. 1000 ml, pH 7.2) e após a lavagem, foi adicionado 20 ml de MMEE com 2% de soro fetal bovino (SFB) por garrafa. Em seguida, as garrafas contendo as amostras virais adsorvidas foram incubadas a 37°C, sendo as culturas observadas diariamente em microscópio de luz invertida (Axiovert 100, Carl Zeiss) quanto ao efeito do aparecimento do efeito citopático (ECP) característico, isto é, formação de sincício, arredondamento celular e inclusões citoplasmáticas. (Buys *et al.*, 1989b).

Após o aparecimento do efeito citopático, as garrafas contendo as amostras virais com ECP característico foram então submetidas a um processo de congelamento (-70°C), descongelamento (4°C) e centrifugação (centrífuga GSGR Bekman Instruments) a 3000 g por 10 minutos. A seguir, o sobrenadante foi cuidadosamente retirado, aliquotado e mantido a - 70°C até o momento de uso. O mesmo procedimento foi adotado para culturas não infectadas e que foram utilizadas como controle (Collins & Gough, 1988).

4- CULTIVO DE ANEL DE TRAQUÉIA

Para a realização dos cultivos de anel de traquéia foram utilizados embriões de galinha SPF de 18-20 dias (Wilding *et al.*, 1986). Os cortes dos anéis traqueais foram feitos com a ajuda de um micrótomo, com espessura em torno de 1 mm, retirando-se previamente a camada de gordura e o tecido conjuntivo que envolve a traquéia.

Em seguida, os anéis foram lavados 2 vezes com PBS pH 7.2 e cerca de 3 a 5 anéis foram colocados em tubos contendo MMEE com 10% de SFB e 2% de antibiótico.

Os inóculos obtidos no item 3 das amostras virais foram inoculados nestes tubos e em seguida incubados a 37°C durante 5 dias e as leituras para a constatação da perda da atividade ciliar (ciliostase) foram efetuadas diariamente.

5 - TITULAÇÃO VIRAL

Na titulação viral foram utilizadas suspensões de células CER (5×10^5 células/ml) obtidas a partir de culturas celulares após 24 horas de incubação a 37°C.

Para o teste foram utilizadas microplacas de poliestireno de 96 cavidades (FALCON 3072), sendo que em cada cavidade foi adicionado 50 µl de MMEE com 2% de SFB, seguido de 50 µl do inóculo diluído (\log_{10} de 10^{-1} a 10^{-8}) das amostras de TRT-vírus e PVA em MMEE com 2% de SFB com 6 repetições. Após a adição de 100µl de cultura de células CER (obtidas de culturas de células após 24 horas de crescimento a 37°C), as placas foram incubadas em estufa de atmosfera úmida de CO₂ a 37°C (Forma Scientific) durante 5 dias ou até o aparecimento do efeito citopático. O TCID₅₀ foi calculado pelo método de Reed & Muench (1938).

serem testadas na primeira coluna da placa. Assim, diluiu-se as amostras em base 2 (\log_2 2 a 10) da esquerda para a direita. A seguir foi adicionado 50 μ l de antígenos viral contendo 100 DICT₅₀/ml e incubação durante uma hora a 37°C em estufa de atmosfera úmida de CO₂. Após a incubação, acrescentou-se 100 μ l de suspensão de células CER e deixou-se incubar durante 5 dias em estufa de atmosfera úmida de 5% de CO₂ até observação do efeito citopático.

O título foi expresso como sendo a maior diluição do soro que inibiu o aparecimento de ECP, levando-se em conta os controles de células, vírus e soros, sendo que em cada placa utilizou-se soros comprovadamente positivo e negativo como controle das diluições virais utilizadas bem como controle de células (Hafez 1990).

Paralelamente, realizou-se uma titulação controle para acompanhamento do título da amostra viral. Foram considerados como soros negativos aqueles que apresentaram título neutralizante igual ou menor que 4, e positivos, aqueles com título igual ou maior que 8.

6.2 - ELISA (ENZYME -LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY)

Amostras virais purificadas de isolados brasileiros e alemão (SHS BR-119, SHS BR-121 e STG 761/88) quantificadas quanto à concentração proteica (Lowry, 1951) foram utilizadas para impregnação de microplacas de ELISA segundo metodologia de por Grant *et al.*, (1987) e Hafez e Loehren (1990).

Assim, diluições ótimas dos antígenos purificados e dos soros de referência positivo e negativo foram obtidas por titulação em bloco, ou seja, fazendo-se reagir várias diluições do antígeno PVA frente a várias diluições de soros referência positiva e negativa com a finalidade de se utilizar a melhor concentração.

Os antígenos utilizados para sensibilização das microplacas de ELISA foi previamente titulado e diluído em tampão carbonato-bicarbonato 0,1 M pH 9.6 (Na₂CO₃

1,59g; NaHCO₃ 2,93g; NaN₃ 0,2g). As colunas ímpares da microplaca foram sensibilizadas com 50µl do antígeno viral e as colunas pares com 50µl do antígeno preparado com células não infectadas (controle).

As microplacas foram incubadas a 4°C durante a noite e, em seguida, lavadas três vezes com PBS/Tween-20 (Sigma Chemical Company). Após a lavagem, colocou-se 50µl de soro de aves a serem testadas, seguido de incubação a 37°C durante uma hora em câmara úmida. Após a incubação, as microplacas foram lavadas novamente com PBS/Tween-20 e adicionou-se 50µl de Ig de coelho anti-IgG de galinha conjugado com peroxidase (Sigma Chemical Company) a cada orifício. As microplacas foram incubadas a 37°C durante uma hora em câmara úmida e os orifícios lavados três vezes com PBS/Tween-20. Após a última lavagem adicionou-se 50µl do substrato enzimático (sal de amônio 2-2 azinodo (ácido 6,3 etilbenzotiazolína sulfônico) da Sigma Chemical Company em cada orifício seguido de incubação a 37°C durante 15 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 50µl de H₂SO₄ (Merck) 3N por orifício.

A leitura das densidades ópticas (DO) de cada cavidade das microplacas foi realizada em leitor de ELISA (Labsystems Multiskan Biochromatic Type 348), sob comprimento de onda de 405 nm e utilizando como branco uma solução constituída somente pelo substrato e bloqueador enzimático. Os resultados de cada amostra foram calculados através do quociente amostra/ positivo de acordo com a fórmula:

$$A/P = \frac{x_A - x_N}{x_P - x_N} \quad \text{Onde,}$$

x_A- Absorbância média do soro da amostra

x_N- Absorbância média do soro de referência negativo

x_P -Absorbância média do soro de referência positivo

6.3 – INOCULAÇÃO EXPERIMENTAL (ESTUDO IN VIVO)

Com o objetivo de estudar a capacidade que o PVA brasileiro tem de induzir a formação de anticorpos neutralizantes, foi realizado um teste *in vivo* seguindo as recomendações de Hafez (1991). O teste de inoculação em aves foi conduzido no Biotério do DMI - IB - UNICAMP. Foram testadas 30 aves SPF com 28 dias de idade e 10 aves SPF, de mesma idade, como controle, todas alojadas separadamente em isoladores. Foram inoculadas duas estirpes de Pneumovírus Aviário: uma de origem brasileira, proveniente de galinhas (SHSBR-119) e outra alemã, isolada de perus (STG 761/88) com títulos virais de $10^{5,3}$ DICT₅₀/ml e $10^{5,5}$ DICT₅₀/ml respectivamente. As aves foram inoculadas com um volume de 100µl/ave (vírus mais PBS 0,05 M, pH 7.3) dividido em 25µl, através das vias ocular, nasal, oral e intramuscular (músculo do peito). Após duas semanas realizou-se a 2ª inoculação nas mesmas condições e vias de inoculação. Os mesmos procedimentos foram realizados com as aves controle, cujo inóculo foi apenas PBS 0,05 M pH 7.3 (sem vírus).

Duas e quatro semanas após a primeira inoculação, foram colhidas amostras de sangue as quais foram centrifugadas a 4°C durante 10 minutos a 1500 g, inativadas a 56°C por 30 minutos, aliquotadas e estocadas a -20°C até o momento de uso.

7 - CARACTERIZAÇÃO VIRAL

7.1- PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

Para a determinação das propriedades físico-químicas do isolado viral foram utilizados os seguintes testes: sensibilidade ao clorofórmio, à temperatura, ao 5-iodo-2-deoxiuridina, sensibilidade ao pH, atividade hemaglutinante e hemadsorção de acordo com a metodologia empregada por Mayr *et al.*, (1974).

Nos testes de sensibilidade ao clorofórmio, à temperatura e pH bem como o efeito do 5-iodo-2- deoxiuridina foram utilizadas monocamadas de células CER com 24 horas de crescimento a 37°C em microplacas de 96 cavidades (Corning).

Após o crescimento celular, o meio de crescimento foi eliminado e então, foram adicionados 0,05 ml de MMEE com 2% de SFB a cada cavidade. O inóculo constou de 0,05 ml de cada diluição (log 10 de 10^{-1} a 10^{-8}) da amostra tratada (nos diferentes testes) e da amostra viral (controle do vírus) em MMEE. A incubação foi realizada a 37°C durante 5 dias em estufa de atmosfera úmida de CO₂ (Forma Scientific). O DICT₅₀ foi calculado de acordo com o método de Reed & Muench (1938).

7.1.1 - TESTE DE SENSIBILIDADE AO CLOROFÓRMIO

A amostra viral foi submetida a agitação durante 1 hora á temperatura ambiente com solução de clorofórmio 10% (Merck) e em seguida mantida a 4°C durante a noite sob refrigeração. Após 24 horas, a amostra foi centrifugada a 3.000g durante 30 minutos e titulada (item 7.1).

7.1.2 - TESTE DE SENSIBILIDADE AO CALOR

Foram usadas alíquotas de suspensão viral distribuídas em 3 tubos, sendo que a amostra do primeiro tubo foi incubada a 56°C em banho-maria, e a do segundo a 60°C durante 30 minutos e a do terceiro permaneceu à temperatura ambiente como controle. A seguir, foi feita a titulação seguindo o tratamento mencionado no item 7.1.

7.1.3 - EFEITO DE 5-iodo -2- deoxiuridina (IUDR)

Para se detectar o efeito do IUDR que age em vírus DNA, foram utilizadas 4 concentrações de IUDR (0 , 10 , 50 e 100 µg/ml) sobre a amostra viral. O inóculo viral foi adsorvido na placa durante 1 hora a 37°C e em seguida, a mesma foi lavada 2 vezes com PBS pH 7,5. Quatro orifícios da placa contendo a mesma diluição viral (10^{-1} até 10^{-8}), receberam 0,05 ml das diferentes concentrações de IUDR acrescido de meio EAGLE com 2% de SFB. Após 24 horas, a placa foi lavada com PBS pH 7,5 e novamente incubada de acordo com a técnica descrita (item 7.1).

Igual tratamento foi realizado para os controles de vírus tanto DNA como RNA. Como controle de vírus DNA foi utilizado o "porcine herpes virus" (PHV-1) inoculado em células VERO (Kidney African Green Monkey) e para vírus RNA, o vírus da doença de Newcastle (Paramixovírus) inoculado em cultura primária de galinha (FEG).

7.1.4 - TESTE DE ESTABILIDADE AO pH

A estabilidade do vírus a pH 3,0; 6,0 e 9,0 foi detectada em períodos de incubação de 10, 30, 60, 180 e 300 minutos. Para o teste utilizou-se a amostra viral, misturando-a em partes iguais com a solução do pH desejado, obtida a partir de mistura de fosfato dissódico (Na_2HPO_4) e ácido cítrico 0,1M (Merck). Como controle utilizou-se uma segunda amostra misturada com uma solução cujo pH era $7,4 \pm 0,4$. Em seguida foram distribuídas em microplacas (item 7.1).

7.1.5 - ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE

Para a determinação da atividade hemaglutinante foram utilizados eritrócitos de galinha, peru, coelho, camundongo, bovino e ovino. Para o teste, foram colhidos 0,5 ml de sangue de galinha, peru, cobaia, coelho e camundongo e 5,0 ml de sangue de bovino e ovino por via endovenosa em tubos contendo 1,0 ml de citrato de sódio 9 (Merck). Após a colheita, as amostras de sangue foram centrifugadas durante 10 minutos a 2.200 g e o sobrenadante foi lavado 2 vezes com solução de PBS 0,05M pH 7,3; ao final da segunda lavagem, o sedimento foi ressuspensão a 50% (solução estoque) com adição de solução de PBS 0,05M pH 7,3.

Para o teste foram utilizadas placas de fundo chato em U (Greiner) apropriadas para o ensaio. A capacidade de hemoaglutinação do PVA foi testada com soluções de eritrócitos 1% (obtidas a partir da solução estoque) das diferentes espécies acima mencionadas á temperatura de 4°C e por períodos de incubação de 30 e 60 minutos.

7.1.6 - TESTE DE HEMADSORÇÃO

Para o teste de hemadsorção utilizou-se culturas celulares cultivadas por 3 a 5 dias em microplacas de 96 cavidades. O meio de cultura foi desprezado, as monocamadas celulares lavadas 2 vezes com PBS pH 7,3 e após a última lavagem foi adicionada a suspensão viral. No teste foram usados diferentes tempos de incubação (2, 4 e 6 horas) e após este período foi adicionado 0,2 ml de suspensão de 7 diferentes eritrócitos a 0,5 % em PBS. Após a adsorção dos eritrócitos por 10 minutos a 37°C, procedeu-se a observação dos resultados ao microscópio.

8 - DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO PROTEICA

A determinação da concentração proteica das amostras de suspensões virais foi determinada de acordo com a metodologia de Lowry (1951) utilizando a soroalbumina bovina (Sigma Chemical Company) como padrão.

9 – PURIFICAÇÃO VIRAL

Os procedimentos de Gough & Collins (1989) foram adotados para a purificação das amostras virais. A suspensão viral (item 3), foi centrifugada a 30.000 g por 1 hora a 4°C (Centrífuga Beckmann modelo L2-21).

O sedimento obtido foi ressuspenso em aproximadamente 2% do volume inicial para cada amostra viral em tampão TRIS-CaCl₂ (TRIS 1M, CaCl₂ 1,5 mM pH 7.4). O concentrado viral foi cuidadosamente adicionado sobre um gradiente descontínuo de sacarose (Merck). Para o gradiente foram utilizados 7 ml da concentração de 30% (p/p) e 2 ml da concentração de 55% (p/p) de sacarose (preparadas a partir de uma solução estoque 66% de sacarose em tampão TRIS – Cloreto de Sódio).

O vírus foi centrifugado a 53.000 g por 1 hora e 30 minutos a 4°C (Ultra-centrífuga Beckmann modelo L 8-80 M) e em seguida, com o auxílio de uma seringa de 3 ml foi retirada a banda viral localizada na junção com a concentração de 55%.

A fração colhida foi novamente centrifugada a 30.000 g por 1 hora a 4°C; o sedimento ressuspenso em tampão TRIS- Cloreto de Sódio (aproximadamente em 0,5% do volume inicial) e armazenado a -70°C em alíquotas de 0,05 ml.

10 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (CONTRASTAÇÃO NEGATIVA)

Para a técnica de contrastação negativa foi utilizada a metodologia de Barth (1984) onde as partículas virais purificadas foram visualizadas através de microscopia eletrônica, com grades recém revestidas de formvar e carbono, tratadas com polilisina (poli-L-lisina) a 0,1% diluída em água destilada (pH 7,2) durante 30 segundos. Em seguida, a suspensão viral foi colocada sobre as grades, durante igual período, sendo o excesso retirado com papel absorvente e lavagens sucessivas com água destilada. Após as lavagens, foi adicionado ácido fosfotúngstico (AFT) 2% com tratamento instantâneo (AFT rápido) ou tratamento durante 30 segundos. As preparações foram então observadas em microscópio eletrônico de transmissão (Zeiss EM modelo 900), em aumentos de 131.000, 142.000 e 309.000 vezes, no Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia (UNICAMP, Campinas - SP).

11 - ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA - SDS

As preparações virais purificadas foram tratadas com SDS (Dodecilsulfato de sódio) 2%, ditioneitol (DTT) 2% e sacarose 5% e aquecidas por dois segundos em banho-maria fervente. Uma mistura contendo 10 µl de solução 0,001% de azul de bromofenol e 25 µl de cada preparação viral (contendo 100 µg de proteína) foram aplicadas ao gel. Os polipeptídeos virais foram analisados de acordo com o processo de Laemmli (1970) usando placas de 13% de acrilamida e 0,35% N-N-metilenobisacrilamida como gel suporte. Como

gel de resolução foi usada acrilamida 3% e N-N metilenobisacrilamida 0,08%. Paralelamente, padrões de pesos moleculares (SIGMA) conhecidos foram também submetidos a eletroforese.

A eletroforese foi realizada durante 6 horas sob corrente constante de 50 - 100 mA e os polipeptídeos foram detectados por coloração do gel com o reagente da prata (Blum *et al.* 1987).

A determinação aparente dos pesos moleculares dos polipeptídeos virais das amostras de isolados de PVA foi feita de acordo com a metodologia de Shapiro *et al.*, (1969).

12 - PRODUÇÃO DE SOROS HIPERIMUNES POLICLONAIS

Foram produzidos antissoros para as amostras virais (Item 1.1) utilizando-se grupos de 3 coelhos fêmeas raça Nova Zelândia.

O inóculo constou de vírus purificado (Item 9) emulsificado com adjuvante de Freund (Gibco) conforme esquema de imunização especificado no quadro 1. No 35º dia efetuou-se a sangria dos animais e os soros policlonais obtidos foram centrifugados a 1.500g durante 10 minutos a 4°C, inativados, aliquotados e mantidos a -20°C até o momento de uso.

QUADRO 1. Esquema de imunização dos coelhos com as amostras de PVA

DIA	INÓCULO	VOLUME (ml)	CONCENTRAÇÃO PROTEICA (µg/ml)	VIA DE INOCULAÇÃO
0	Ag + ACF	1,0	400	Subcutâneo
14	Ag + AIF	1,0	400	Intramuscular
28	Ag + AIF	1,0	400	Intramuscular
35	SANGRIA			

Ag - Antígeno

ACF - Adjuvante Completo de Freund

AIF - Adjuvante Incompleto de Freund

IV- RESULTADOS

1. Adaptação Viral dos Isolados de PVA

1.1- Células CER ("Chicken Embryo Rough")

Todos os isolados virais foram adaptados, após passagens sucessivas em culturas de células CER ("Chicken Embryo Rough") e o número de passagens celulares variou de 2 a 8 conforme mostra a Tabela 3.

Tabela 3 – Número de passagens de isolados de PVA em células CER.

AMOSTRA VIRAL	Número de passagens ^a CER ^b
STG 761/88	2
BUT1=8544	7
CVO-3	8
STG-IS ₂ 91	3
SHS BR-119	2
SHS BR-121	2

^a Passagens em garrafas de 25 cm². ^b "Chicken Embryo Rough"

Na figura 1a observamos uma monocamada de células CER normais e as figuras 1b e 1c mostram o efeito citopático (formação de sincício e arredondamento celular) causado por SHS BR-119 e SHS BR-121 em monocamadas de células CER após 72 horas de incubação a 37° C.



Figura 1a - Monocamada de células CER normais.

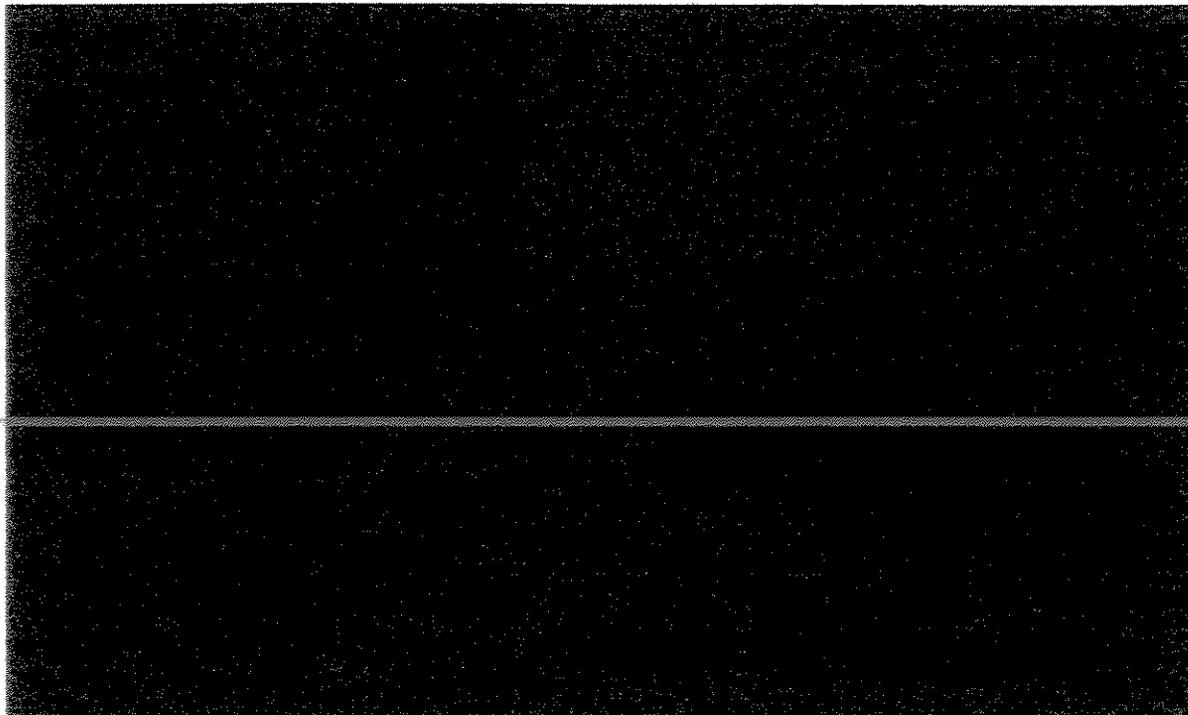


Figura 1b - Monocamada de células CER com efeito citopático causado por SHS BR-119.

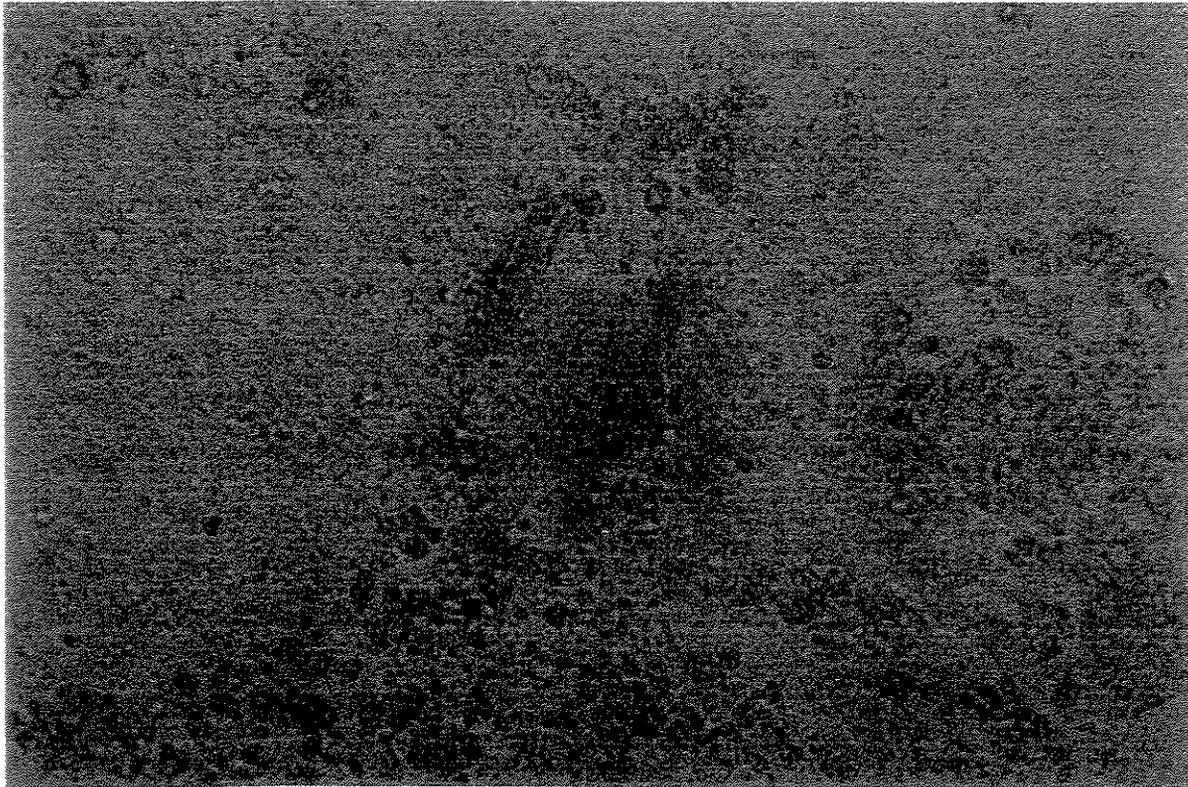


Figura 1c - Monocamada de células CER com efeito citopático causado por SHS BR-121.

1.2 - Células VERO

As figuras 2a, 2b e 2c mostram monocamadas de células VERO normais e monocamadas de células VERO com efeito citopático causado por SHS BR-119 e SHS BR-121 após 72 horas de incubação a 37°C, respectivamente.

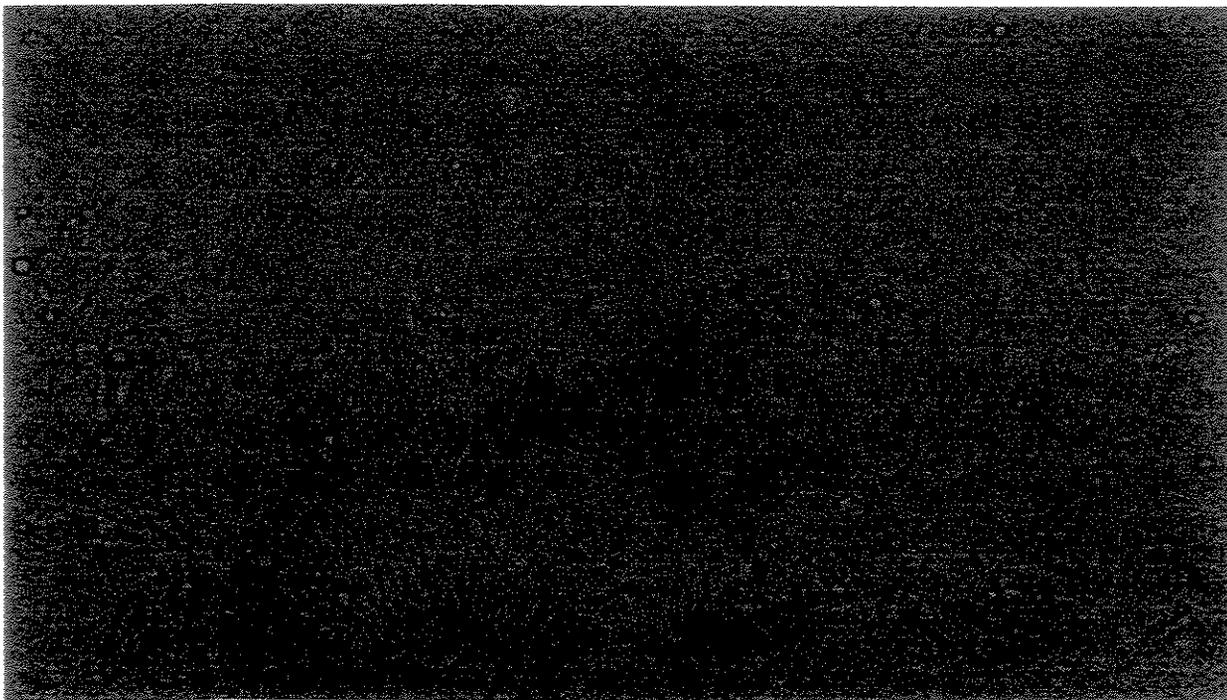


Figura 2a - Monocamadas de células VERO normais.



Figura 2b - Monocamadas de células VERO com efeito citopático causado por SHS BR-119.

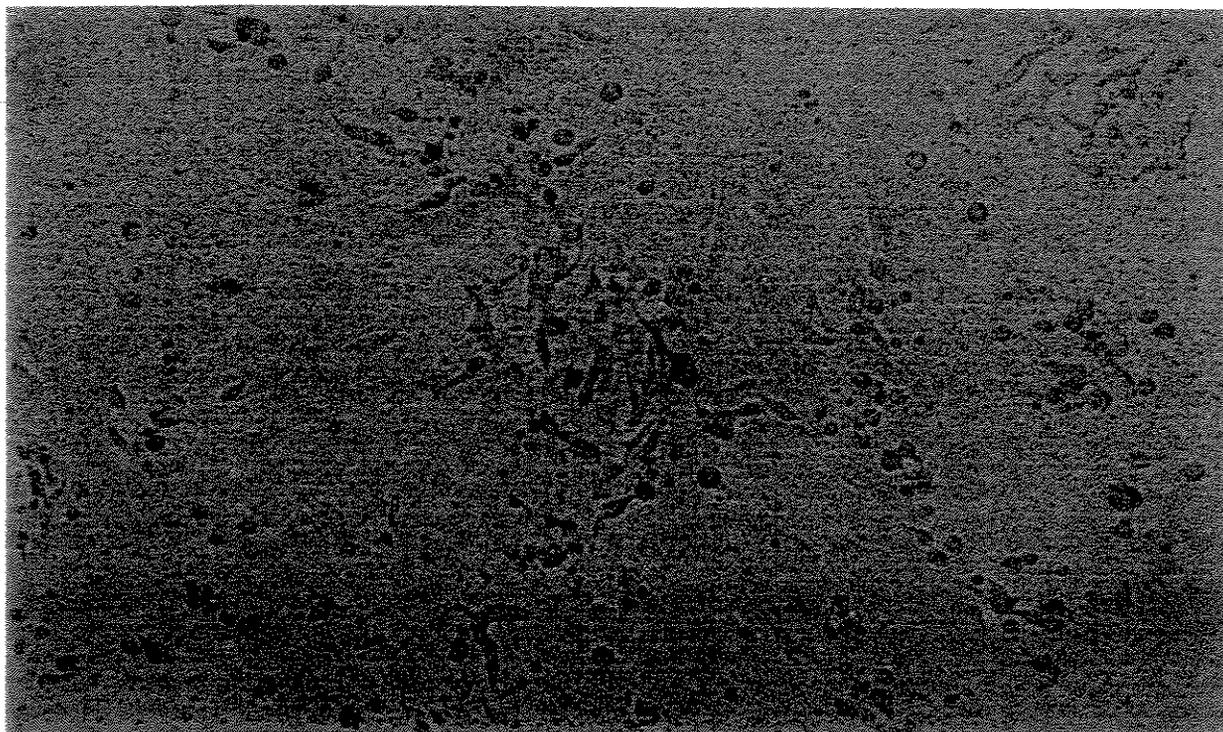


Figura 2c - Monocamadas de células VERO com efeito citopático causado por SHS BR-121.

1.3 - Cultura de Células Primárias FEG

As figuras 3a e 3b mostram monocamadas de cultura de células primárias FEG controle e monocamadas de células primárias com efeito citopático causado por SHS BR-119 após 72 horas de incubação a 37°C, respectivamente.

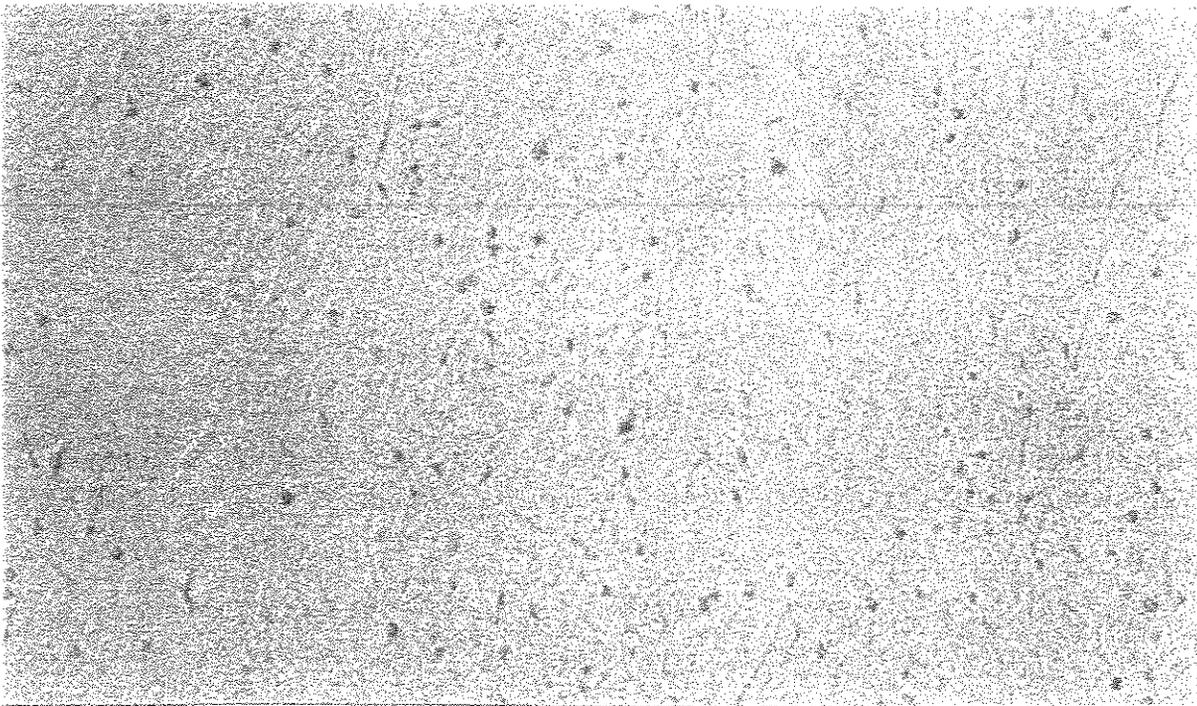


Figura 3a - Monocamada de células primárias FEG.

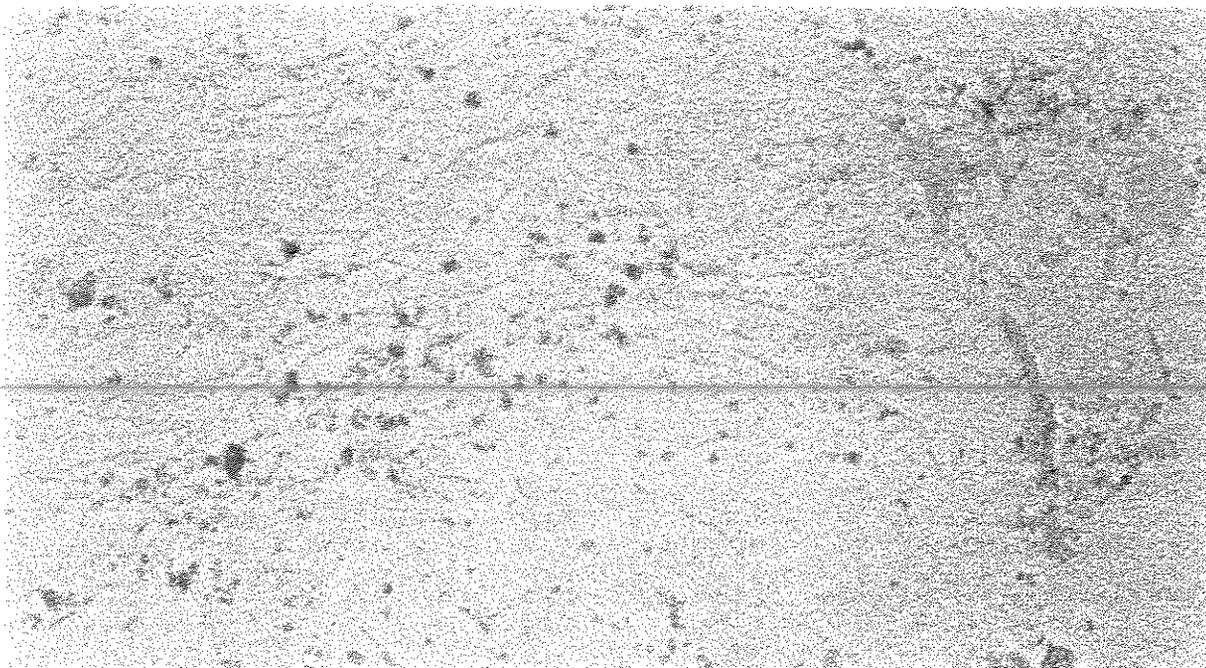


Figura 3b - Monocamadas de células primárias FEG apresentando efeito citopático causado por SHS BR-119.

2. Título viral dos isolados

Na Tabela 4 podemos observar os valores do título infeccioso 50% em cultura de células CER por ml dos 6 isolados de PVA.

Tabela 4: Títulos das amostras de PVA

CEPAS VIRAIS	ORIGEM	TÍTULO VIRAL ^a (log ₁₀ TICD ₅₀ /ml)
SHS BR-119	BRASIL	6,0
SHS BR-121	BRASIL	6,5
STG 761/88	ALEMANHA	6,2
BUT1=8544	INGLATERRA	5,7
CVO-3	FRANÇA	5,5
STG-IS/2	ALEMANHA	6,0

^a Título infeccioso 50% em cultura de células por ml.

3- Cultivo em anel de traquéia

Os resultados deste teste (Tabela 5) mostraram que até a sétima passagem viral em anéis de traquéia, apenas na amostra viral BUT1=8544 (Inglaterra) foi detectada uma perda da atividade ciliar (na segunda passagem), enquanto que nas outras cepas de PVA não foi observada nenhuma ciliostase.

Tabela 5 – Cultivo em anel de traquéia de isolados de PVA

Cepas Virais	Título viral (log ₁₀ TICD ₅₀ /ml)	Número de passagens	Ciliostase
SHS BR-119	6,0	7	negativa
SHS BR-121	6,5	7	negativa
STG 761/88	6,2	7	negativa
STG-IS/2	6,0	7	negativa
BUT1=8544	5,7	7	negativa
CVO-3	5,5	7	positiva (2 ^a passagem)

4- Purificação Viral

Após a purificação em gradiente descontínuo de sacarose, os isolados de PVA foram titulados. A Tabela 6 apresenta o título viral dos isolados de PVA antes e após a purificação.

Tabela 6 - Título viral dos isolados de PVA antes e após a purificação.

Cepas virais	Título viral Amostra bruta (log ₁₀ TICD ₅₀ /ml)	Título viral Amostra purificada (log ₁₀ TICD ₅₀ /ml)
SHS BR-119	6,0	8,0
SHS BR-121	6,5	8,3
STG 761/88	6,2	8,0
STG-IS/2	6,0	7,4
BUT1=8544	5,7	7,0
CVO-3	5,5	6,2

5- Concentração protéica dos isolados de PVA

Após purificados, os isolados de PVA foram analisados quantitativamente quanto ao teor de proteínas e os resultados são expressos na Tabela 7.

Tabela 7 - Concentração protéica (µg/ml) dos isolados de PVA após purificação.

AMOSTRA	SHS BR-119	SHS BR-121	STG 761/88	STG-IS2	BUT1=8544	CVO-3
µg/ml	1020	1560	1300	1950	1360	1040

6- Soroneutralização cruzada

No teste de soroneutralização cruzada foram utilizados os isolados de PVA (SHS BR-119 e SHS BR-121) brasileiros e os provenientes da Alemanha (STG 761/88 e STG IS₂), França(CVO3) e Inglaterra (BUT1=8544). Os isolados padrões e seus respectivos antissoros policlonais foram cruzados com os isolados brasileiros (Tabela 8).

Tabela 8 - Teste de soroneutralização cruzada (TÍTULO em log₂) dos isolados de PVA.

	SHS BR-119	SHS BR-121	STG 761	BUT	CVO3	STG-IS2
SHS BR-119	<u>10,5</u>	10,0	8,5	8,3	7,3	7,6
SHS BR-121	9,8	<u>10,0</u>	8,2	7,8	6,9	6,9
STG 761/88	8,1	7,9	<u>10,2</u>	9,0	7,0	6,8
BUT1=8544	8,0	7,8	8,3	<u>10,3</u>	6,9	6,0
CVO3	6,8	6,4	6,0	6,5	<u>8,0</u>	6,5
STG IS ₂	6,5	6,0	8,0	7,3	8,0	<u>7,8</u>

Os resultados da sorologia cruzada mostraram a existência de semelhança antigênica entre todos os isolados de PVA analisados. Resultados similares foram observados por Giraud et al.,(1988) comparando cepas isoladas de galinha com cepas isoladas de perus na França. Gough e Collins (1989) corroboraram estes resultados através de estudos sorológicos de 2 cepas provenientes de perus da Inglaterra e França.

7 – Sorologia (ELISA e Teste de Soroneutralização – SN)

As Tabelas 9 e 10 apresentam os resultados de análise sorológica onde pode observar que a soropositividade (anti-PVA) para aves matrizes é de 67% (teste ELISA) e 66,5% (teste SN) e para frangos de corte 2,9% (teste ELISA) e 5,1% (teste SN).

As amostras de aves matrizes foram colhidas de lotes que tinham relação direta com história clínica da Síndrome da Cabeça Inchada e ou com distúrbios respiratórios. No entanto, os soros procedentes de lotes de frangos de corte não apresentavam problemas clínicos de Síndrome da Cabeça Inchada.

Estes soros foram procedentes de laboratórios públicos (Instituto de Biologia/SP, LARA/Campinas e de Universidades) e de laboratórios particulares.

Tabela 9: Análise Sorológica de Frangos de corte contra PVA (SHS BR-119) através dos testes de ELISA e soroneutralização (100 DICT 50%)

Nº de amostras	Nº de lotes	Pos. ELISA %	Pos. SN %
724	38	21 (2,9%)	37 (5,1)

Tabela 10: Análise sorológica de aves matrizes contra PVA (SHS BR-119) através dos testes de ELISA e Soroneutralização (100 DICT 50%).

Nº de amostras	Nº de lotes	Pos. ELISA %	Pos. SN %
901	57	604 (67%)	599 (66,5%)

8 - Inoculação Experimental

As Tabelas 11 e 12 mostram os resultados dos testes de soroneutralização e ELISA realizados com soros obtidos de amostras de sangue colhidas das aves SPF inoculadas experimentalmente com estirpes brasileira e alemã, bem como, de aves controle (sem vírus).

Tabela 11: Resultados sorológicos (Teste de SN e ELISA) das aves inoculadas com amostra brasileira (SHSBR-119).

Soros/ Testes sorológicos	1 ^a COLETA n=30	2 ^a COLETA N=30	Controle Negativo Aves SPF N=10
Título Teste SN (log2)			
Média	2 ^{3,8}	2 ^{9,9}	Negativo
Teste ELISA (ODD)			
Média	0,292	1,407	0,007

Tabela 12: Resultados sorológicos (Teste de SN e ELISA) das aves inoculadas com amostra alemã (STG 761/88).

Soros/ Testes sorológicos	1 ^a COLETA n=30	2 ^a COLETA n=30	Controle Negativo Aves SPF n=10
Título Teste SN (log2)			
Média	2 ^{3,8}	2 ^{8,9}	Negativo
Teste ELISA (ODD)			
Média	0,395	1,311	0,007

O teste de inoculação em aves mostrou que as estirpes analisadas (brasileira e alemã) foram capazes de estimular anticorpos neutralizantes nas aves SPF duas e quatro semanas após as inoculações. Na segunda coleta (quatro semanas após a primeira inoculação) foi observado um acréscimo dos níveis de anticorpos, tanto no teste de soroneutralização como no teste de ELISA.

9- Microscopia Eletrônica

Na figura 5 podemos observar as imagens obtidas ao microscópio eletrônico de amostra purificada de isolado brasileiro de PVA.

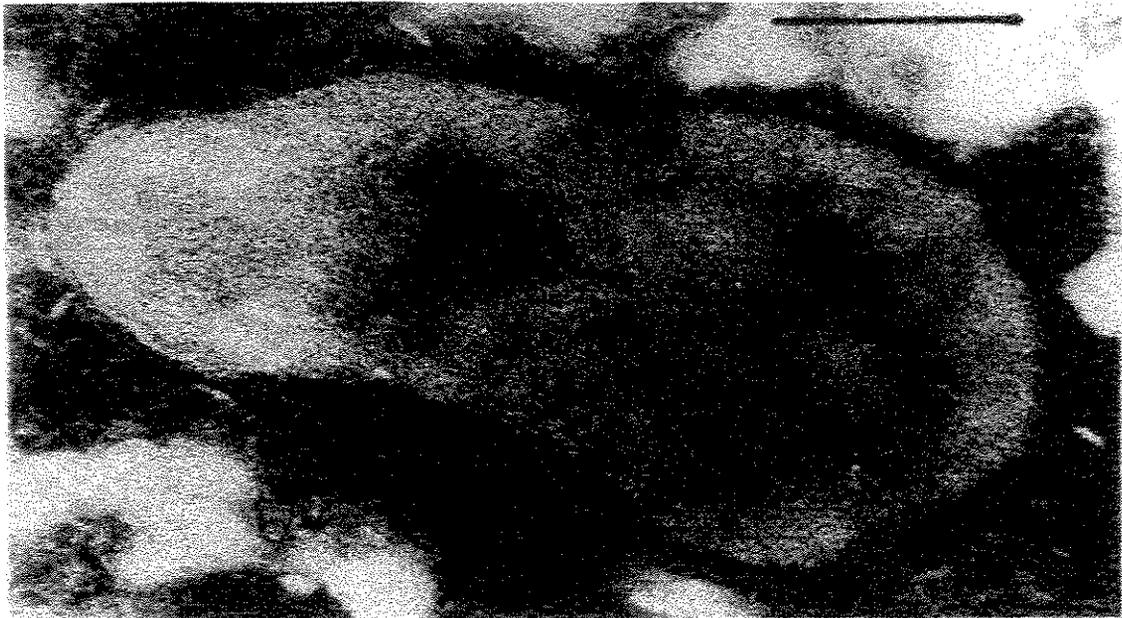


Figura 5: Microfotografia eletrônica do PVA (SHS BR-119), corada negativamente, aumento 131.000 x (100nm).

A análise da amostra de isolado brasileiro de PVA revelou grande número de virions pleomórficos. Formas esféricas com tamanho aproximado de 100 a 300 nm de diâmetro são mostradas. Os virions apresentam espículas que emergem da superfície e nota-se também a presença de espécimes incompletos ou destruídos. Características morfológicas estão de acordo com as do PVA, permitindo-nos afirmar que o vírus isolado no Brasil, procedente de aves matrizes, trata-se de uma amostra brasileira de PVA.

10- PAGE-SDS

O perfil eletroforético em gel de poliacrilamida SDS das amostras de isolados de PVA (duas brasileiras, duas alemãs, uma francesa e uma inglesa) e os pesos moleculares dos polipeptídeos virais foram muito similares (Figura 6). A comparação entre os perfis eletroforéticos de material oriundo de culturas celulares infectadas e não infectadas indicam a presença de polipeptídeos virais, cujo pesos moleculares aparentes são 200, 84, 67, 54, 43, 39, 37, 28 e 14 KDa.

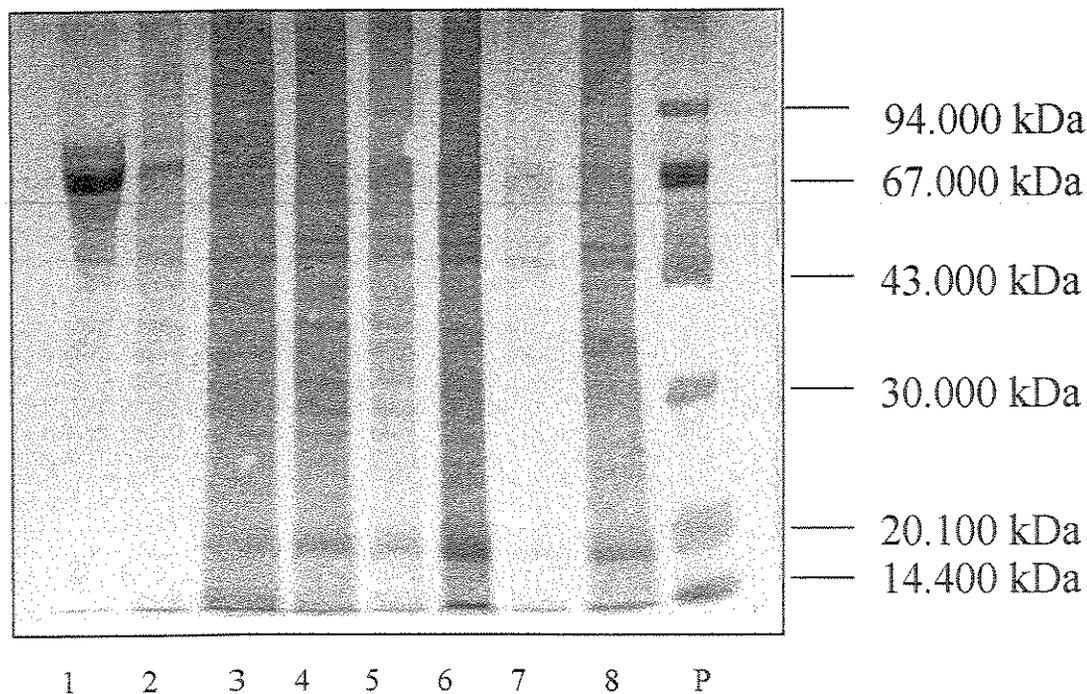


Figura 6: Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS 13% revelada com nitrato de prata. 1 SHS BR-121 não purificado; 2 controle negativo (célula CER); 3 SHS BR-119; 4 SHS BR-121; 5 STG; 6 IS6; 7 BUT1=8544; 8 CVO3; 9 padrão de peso molecular.

11- Caracterização Viral

Para caracterização viral dos isolados brasileiros de PVA foram utilizados testes como a termoestabilidade, sensibilidade ao clorofórmio e o efeito de 5-iodo-2deoxy-uridina (IUDR) desenvolvidos em culturas de células CER.

O tratamento com IUDR nas diferentes concentrações analisadas (0, 10, 50 e 100 $\mu\text{g/ml}$) não afetou a capacidade infectante, demonstrando que o mesmo é um vírus PVA. O mesmo foi observado em relação ao efeito do clorofórmio sobre os isolados de PVA.

Estes dados nos permitem concluir que os isolados de PVA brasileiros tratam-se de vírus envelopados e que após a destruição pelos agentes acima testados comprometem a infectividade dos mesmos.

Os tratamentos dos isolados brasileiros de PVA a diferentes valores de pH mostraram a estabilidade viral numa faixa ampla de pH 6.0 a 9.0 à temperatura de 4°C; esta estabilidade foi afetada pelo tempo de exposição a 4°C, principalmente após 180 minutos. À pH 3.0 não se observou nenhum ECP e sim uma toxicidade em relação as células (Tabela 13).

Tabela 13 - Efeito de diferentes valores de pH na replicação da amostra viral SHSBR-119 em cultura de células CER (Título \log_{10} DICT₅₀/ml).

	15	30	60	180	300
3,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
6,0	6,0	5,3	5,0	3,8	0,0
7,4	6,5	5,5	5,3	4,0	0,0
9,0	6,0	5,3	5,3	4,8	0,0

Para a atividade hemaglutinante foram utilizados eritrócitos de galinha, peru, cabaia, coelho, camundongo, bovino e ovino na concentração de 1% em solução salina. Os períodos de incubação dos isolados brasileiros de PVA (SHS BR-119 e SHS BR-121) com os glóbulos descritos acima foram de 30 e 60 minutos a 4°C.

Os resultados observados mostraram que os isolados brasileiros de PVA aglutinam eritrócitos das diferentes espécies, visto que não se observou nenhuma atividade aglutinante após 30 e 60 minutos de incubação.

A atividade de hemadsorção foi determinada utilizando-se dos mesmos tipos de eritrócitos, sendo que os períodos de incubação viral foram 2, 4 e 6 horas.

No teste de hemadsorção, utilizando-se dos mesmos tipos de eritrócitos observou-se que após 2, 4 e 6 horas de incubação dos isolados brasileiros de PVA na linhagem de células testada (CER) os resultados observados foram negativos.

V- DISCUSSÃO

A Síndrome da Cabeça Inchada (SCI) é uma doença aguda respiratória que acomete aves domésticas, principalmente galinhas e perus, causando prejuízos econômicos, (Hafez & Weiland 1990 a). Atualmente, sabe-se que é uma enfermidade resultante de infecção mista do vírus da rinotraqueíte de perus (TRTV) com bactérias, principalmente a *Escherichia coli*, onde o agente viral causa uma rinite aguda permitindo a infecção da bactéria *E. coli* no tecido subcutâneo facial, Hafez & Weiland (1990b).

Desde o seu primeiro relato na África do Sul em 1984, esta enfermidade tem ocorrido em muitos outros países, tornando-se um relevante problema econômico. Devido à dificuldade do seu diagnóstico baseado somente em sinais clínicos da SCI, desenvolveram-se trabalhos de adaptação do PVA em culturas celulares a fim de utilizá-los nos testes de soroneutralização (SN), ensaio imunoenzimático (ELISA) e imunofluorescência (IF) para detecção de anticorpos, (Jones 1996; Cook 1997).

O presente trabalho teve como objetivo a caracterização morfológica, sorológica, físico-química e bioquímica de isolados brasileiros de PVA.

A adaptação de isolados brasileiros de PVA em culturas de células (CER, VERO e FEG) apresentada na Tabela 3 levando ao aparecimento de efeito citopático característico, isto é, formação de sincício, arredondamento celular e inclusões citoplasmáticas (Figuras 1b, 1c, 2b, 2c e 3b) após a incubação a 37°C durante 3 a 5 dias estão de encontro com os achados de Buys *et al.* (1989a), D'Aprile (1989a), Hafez & Weiland (1990); Shakal & Koch (1995).

Em relação ao cultivo em anel de traquéia, os resultados observados na Tabela 4 estabelece uma similaridade dos isolados brasileiros de PVA com outros isolados de países diferentes conforme observações de Hafez (1992) e Naylor & Jones (1994). Já a obtenção de títulos virais maiores (Tabela 1) para fins de identificação e caracterização, houve necessidade de adaptação dos isolados brasileiros por passagens subsequentes em

culturas celulares como observado por Buys et al. (1989a), D'Aprile (1989a), Hafez & Weiland (1990) e Shakal & Koch (1995).

A metodologia empregada para caracterização do vírus, ou seja, testes de termoestabilidade, sensibilidade ao clorofórmio, efeito do UIDR, estabilidade ao pH, hemoaglutinação e hemadsorção mostraram que estamos frente a um vírus aviário RNA, não hemaglutinante, envelopado, cujo efeito citopático característico é a formação de sincícios. Estas características físicas e químicas vão de encontro aos resultados observados por Collins et al. (1986); McDougall & Cook (1986); Collins & Gough (1988); Buys et al. (1989c); Hafez & Weiland (1990); Hafez (1992) que relataram a sensibilidade do vírus ao clorofórmio e éter, bem como a sua inativação pelo calor a 56°C ou 60°C durante 30 minutos. Também se observa concordância com os resultados de Hafez e Arns (1991), Giraud et al. (1988); Arns & Hafez (1992) que relataram a sensibilidade do PVA em relação a agentes desinfectantes e estabilidade em intervalos de pH entre 3,0 e 9,0.

A morfologia observada através da microscopia eletrônica de isolados brasileiros de PVA (Figura 5) que mostra um vírus pleomórfico, formas esféricas com diâmetro de 100 a 300 nm e espículas emergindo da superfície permitiram-nos identificar este isolado como sendo uma amostra brasileira de PVA. A grande variabilidade morfológica, bem como o grande número de partículas incompletas encontradas estão de acordo com os achados de Gough et al. (1994) que observaram formas pleomórficas e filamentosas de 100 nm de diâmetro e Gough & Collins (1988) que analisaram 3 isolados e descreveram grande número de formas pleomórficas, formas filamentosas e esféricas (com tamanho de 80 a 200nm) além de espículas projetando da superfície com 13 a 14nm de comprimento.

A ocorrência de anticorpos anti PVA em amostras procedentes de aves matrizes e frangos de corte, foram observadas através dos testes de soroneutralização e ELISA (Tabelas 9 e 10) e resultados semelhantes são relatados por Morley e Thomson (1984); Cook et al. (1988); Hafez & Lorhen (1990) e Otsuki et al. (1996) em diferentes países e sistemas de criações comerciais diversos.

Índices elevados de anticorpos são observados por ELISA e soroneutralização em matrizes com sinais clínicos característicos de SCI, ou seja, 67% e 65,5% (Tabela 10). Estes dados estão de acordo com pesquisa realizada por Cook et al. (1988) que demonstraram anticorpos em matrizes com e sem sinais clínicos, sendo que os lotes com sinais de SCI apresentavam maior quantidade de soros positivos. Analisando soros pareados, Pattison et al. (1989) demonstraram títulos superiores de anticorpos em aves com sinais clínicos.

Em frangos de corte foram encontrados baixos índices de anticorpos (2,9 e 5,1%) na análise de soros através de SN e ELISA (Tabela 9). Isto se deveu provavelmente ao fato de que os frangos não foram vacinados, ocorrendo assim uma queda nos títulos dos anticorpos maternos e também pela disseminação e multiplicação lenta do PVA. Estes resultados se assemelham aos encontrados por Pattison et al. (1989) e Otsuki et al. (1996) e em infecções primárias por detectar IgM. Baxter-Jones et al. (1989) descreveram uma correlação entre os resultados obtidos nos testes de ELISA e SN. Inicialmente os anticorpos foram detectados por SN, sendo que diferenças entre os títulos demonstrados pelo teste de ELISA só diminuíram no 13º dia. Jones et al. (1988) observaram que os níveis de anticorpos detectados pelo teste de SN foram mais elevados até 12 dias após a infecção, quando então observaram aumento nos títulos de anticorpos analisados pelo teste de ELISA.

A inoculação experimental dos isolados brasileiros (SHS BR-119 e SHS BR 121) e alemão (STG 761/88) em aves SPF mostrou uma reação similar entre os diferentes isolados além da ocorrência de conversão sorológica logo após a primeira inoculação.

O perfil eletroforético em PAGE-SDS dos 6 isolados de PVA analisados e os respectivos pesos moleculares dos polipeptídeos virais mostraram similaridade, sendo os pesos moleculares aparentes de 200, 84, 67, 54, 43, 39, 37, 30, 28, 24, 20 e 14 KDa. Os polipeptídeos virais de pesos moleculares de 43 e 30 KDa tem sido designados como proteínas N (nucleoproteína) e M (matriz), respectivamente, Collins & Gough, (1988); Ling

& Pringle, (1988). Os polipeptídeos virais de pesos moleculares de 84 e 67 KDa tem sido denominados como proteínas G (proteína glicosilada responsável pela ligação do vírus à célula do hospedeiro) e F (fusão) (Collins & Gough, 1988; Ling & Pringle, 1988 ; Gough & Collins, 1989; Fenner 1993). Os polipeptídeos virais de pesos moleculares de 35 – 40 e 200 KDa tem sido atribuídos à fosfoproteína P e proteína L (função de polimerase).

VI - CONCLUSÕES

1. Os isolados brasileiros de PVA apresentaram melhores efeitos citopáticos em linhagem celular CER;
2. Os títulos virais mais elevados dos isolados brasileiros de PVA foram encontrados em linhagem de células CER;
3. Em cultura de anel traqueal, não foram observadas nenhuma ciliostase nos isolados brasileiros de PVA até a sétima passagem;
4. Análises sorológicas comparando os diferentes isolados de PVA mostraram a existência de semelhança antigênica entre eles;
5. O teste sorológico do PVA mostrou uma positividade anti SHS BR-119 para aves matrizes de 67 e 66,5% e para frangos de corte de 2,9 e 5,1% através dos testes de ELISA e soroneutralização respectivamente;
6. Os resultados da inoculação experimental em aves SPF mostraram ocorrência de conversão sorológica após a primeira inoculação;
7. Os resultados obtidos por microscopia eletrônica mostraram imagens de vírus arredondado com diâmetro de 100 a 300 nm, com características pleomórficas e presença de espículas, as quais estão de acordo com as características morfológicas do Pneumovirus Aviário (PVA);
8. Análise eletroforética em PAGE-SDS revelou a presença de polipeptídeos virais com pesos moleculares aparentes de 200, 84, 67, 54, 43, 39, 37, 30, 28, 24, 20 e 14 KDa;

9. Os isolados brasileiros de PVA mostraram ser sensíveis ao clorofórmio, genoma constituído de RNA termolábeis, estáveis em faixa de pH 6 e 9, não hemaglutinante e sem atividade de hemadsorção.
-

VIII- BIBLIOGRAFIA

- AFSHAR, A., HECKERT, R., MYERS, D.J., RIVA, J. Development and evaluation of an Enzyme-linked-Immunoabsorbent Assay for the detection of antibodies to avian Pneumovirus. **Avian Dis.**, 38, 694-700, 1994.
- ALEXANDER, D.J. Avian Paramyxoviridae recent developments. **Vet. Microbiol.**, 23: 103-114, 1990.
- ALEXANDER, D.J. **Pneumovirus infections** (Turkey Rhinotracheitis and Swollen Head Syndrome of Chickens). In: Diseases of poultry, Edited by Calnek, B.W., BARNES, H.J., BEARD, C.W., REID, W.M., YODER JR., 9th Ed., Iowa State University Press, Ames., pp.669-673, 1991.
- ALEXANDER, D.J. Pneumoviruses (Turkey Rhinotracheitis and Swollen Head Syndrome of Chickens). In: McFERRAN, J.B.; Mc NULTY, M.S. eds **Virus Infections of Birds**. Amsterdam , Elsevier Science Publishers B.V., 1993, p. 3782.
- ALEXANDER, D.J., COLLINS, M.S. The purification and polypeptide composition of avian infectious bronchitis virus. **Microbios**, 18: 87-98, 1977.
-
- ARNS, C.W., HAFEZ, H.M. Swollen head syndrome in poultry flocks in Brazil. In: **Proc. of the 41st Western Poultry Dis. Conf.**, Sacramento, California, USA pp. 81-84, 1992.
- ARNS, C.W., HAFEZ, H.M. Isolation and Identification of Avian Pneumovirus from Broiler Breeder flocks in Brazil. In: **Proc. of the 44st Western Poultry Dis. Conf.**, Sacramento, California, USA, 1995, p. 124-125.
- AVELLANEDA, G.E. & VILLEGAS, P. Síndrome de Cabeza Hinchada. **Avic. Prof.**, 11, 56-62, 1993.

BARTH, O.M. Estudos sobre a contrastação negativa de suspensões virais. **R. bras. Biol.**, 44 (1): 71-80, 1984.

BAXTER-JONES, C; WILDING, G.P., GRANT, M. Immunofluorescence as a potential diagnostic method for turkey rhinotracheitis. **Vet. Rec.**, 119: 600-601, 1986.

BAXTER-JONES, C., COOK, J.K.A., FRAZIER, J.A., GRANT, M., JONES, R.C., MOCKETT, A.P.A., WILDING, G.P. Close relationship between TRT virus isolates. **Vet. Rec.**, 121: 562-564, 1987.

BELL, I.G., ALEXANDER, D.J. Failure to detect antibody to turkey rhinotracheitis virus in Australian Poultry flocks. **Aust. Vet. J.**, 67: 232-233, 1990.

BLUM, M., BEIER, M., GROSS, H.J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, 181: 93-99, 1987.

BURNETTE, W.N. "Western blotting": Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate- polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioionated protein A. **Anal. Biochem.**, 112: 195-203, 1981.

BUYS, S.B., DU PREEZ, J.H., ELS, H.J. Swollen head syndrome in chickens: a preliminary report on the isolation of a possible aetiological agent. **J. of South African Vet. Assoc.**, 60: 221-222, 1989a.

BUYS, S.B., DU PREEZ, J.H., ELS, H.J. The isolation and attenuation of a virus causing rhinotracheitis in turkeys in South America. **Onderstepoort J. of Vet. Res.**, 56: 87-98, 1989b.

- BUYS, S.B., Du PREEZ., A preliminary report on the isolation of a virus causing sinusitis in turkeys in South America and attempts to attenuate the virus. **Turkeys** 28: 36-46, 1980.
- CALNEX, B.W. **Diseases of poultry**, 9th Edition, Iowa, State University Press, Ames, 1995, p. 669-673.
- CADMAN, H.F., KELLY, P.J., ZHOU, R., DA UELAAR, F., MASON, D. A serosurvey using enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies against poultry pathogens in ostriches from Zimbabwe. **Avian Dis.**, 38: 621-625, 1994.
- CAVANAGH, D., JING, L., COOK, J.K.A., BROWN, D.K.T., SHAWN, K. Detection of turkey rhinotracheitis virus in turkeys using the polymerase chain reaction. **Avian Pathol.**, 22: 771-783, 1993.
- CHETTLE, N. J., EDDY, P. K., WYETH, P. J. The isolation of infections Bursal Disease virus from turkeys in England. **Brit. Vet. J.**, 141:45, 1985.
- COLLINS, M.S., GOUGH, R.E., LISTER, A., CHETTLE, N., EDDY, R. Further characterization of a virus associated with turkey rhinotracheitis. **Vet. Rec.**, 119(13): 606, 1986.
-
- COLLINS, M.S., GOUGH, R.E. Characterization of a virus associated with turkey rhinotracheitis. **J. Gen. Virol.**, 69: 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 Pathol.**, 22: 469-479, 1993.
- COOK, J.K.A. Isolation, characterization and serological relatedness of turkey rhinotracheitis viruses from domestic poultry. In: **Newly Emerging and Remerging**

Avian Diseases: Applied Research and Practical Applications for Diagnosis and control. Minneapolis, Associations for Avian Pathologists, 1993, p. 56-61.

COOK, J.K.A. Doenças Respiratórias em galinhas, incluindo a significância do pneumovírus aviário. In: **Conferência APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas.** São Paulo, 1997, p. 29-43.

COOK, J.K.A., Mc DOUGALL. Rhinotracheitis of turkeys in Britain-laboratory investigations. Programme of the Meeting of the Working Group 7&8. **Turkey pathology and waterfowl in Lyon, France,** August, 1986, p.20-22.

COOK, J.K.A., DOLBY, C.A., ELLIS, M.M. Turkey rhinotracheitis In: **10th Technical Turkey Conference,** Cambridge, UK, 1987.

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 Pathol.**, 17: 403-410, 1988.

COOK, J.K.A., ELLIS, M.M., HUGGINS, M. B. The pathogenesis of turkey rhinotracheitis virus in turkey poultry inoculated with the virus alone or together two strains of bacteria. **Avian Pathol.**, 20:155-66, 1991.

COOK, J.K.A., JONES, B.V., ELLIS, M.M., JING, L., CAVANGH, D. Antigenic differentiation of strains of turkey rhinotracheitis virus using monoclonal antibodies. **Avian Pathol.**, 22: 257-273, 1993a.

COOK, J.K.A., KINLOCH, S., ELLIS, M.M. In vitro and in vivo studies in chickens and turkeys on strains of turkey rhinotracheitis virus isolated from two species. **Avian Pathol.**, 22: 157-170, 1993b.

D'APRILE, P.N. Behaviour of turkey rhinotracheitis virus in cells of avian and mammalian origin. **Abstracts of the IXth International Congress WVPA**, Brighton, 1989, p. 9.

DANI, M. A. G., DURIGON, E. L., ARNS, C. W. Molecular characterization of Brazilian avian pneumovirus isolate: Comparison between immunochemiluminescent Southern-Blot and nested PCR. **J. of Virol. Methods**, (1999) in Press.

DANI, M. A. G., ARNS, C. W., DURIGON, E. L. Molecular characterization of Brazilian Avian Pneumovirus isolate using RT-PCR, restriction analysis and sequencing of G gene fragments. **Avian Pathol.**, (1999) in Press.

DECANINI, E.L., MIRANDA, E.C., LE GROS, F.X. Swollen head syndrome in heavy breeders in Mexico. In: **Proceedings Poultry of the 40th Western Poultry Disease Conference**, Acapulco, Mexico, 1991, p. 158-161.

DIAZ DE ESPADA, E. & PERONA, M.E. Etiologia del síndrome de cabezas hinchada. **R. de la Sec. Esp. de la Assoc. Mund. de Avic. Cient.**, 40: 36-42, 1984.

DROUIN, P., TOUX, J.Y., PICAULT, J.P. Le Syndrome infectieux de la grosse tête chez l'espèce poule. **L'Aviculteur** 460: 93-96, 1985.

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

EL HOUADFI, M., HAMAN, A., VANMARCKE, J., HAMAN, A. Swollen head syndrome in broiler chickens in Maroco. In: **Proceeding of the 40th Western Poultry Disease Conference**, Acapulco, Mexico, 1991, p. 126-127.

- ETERRADOSSI, N., TOQUIN, D., GUITTET, M., BENNEJEAN, G. Discrepancies in Turkey Rhinotracheitis ELISA results using different antigens. **Vet. Rec.**, 131:563, 1997.
- FENNER, F.J. Paramyxoviridae. In: FENNER, F.J.; GIBBS, E.P.J.; MURPHY, F.A.; ROTT, R.; STUDDERT, M.J.; WHITE, D.O eds. **Veterinary Virology**, 2 ed. San Diego: Academic Press, 1993, p. 471-78.
- GERRARD, C., WHITWORTH, A., CHETTLE, N. J. S., LOYETH, P. Avian Rhinotracheitis diagnostic Kit. **Vet. Rec.**, 126:342, 1990
- GIRAUD, P., BENNEJEAN, G., GUITTET, M., TOQUIN, D. A possible viral candidate for the aetiology of turkey rhinotracheitis. **Vet. Rec.**, 118: 81-83, 1986a.
- GIRAUD, P., BENNEJEAN, G., GUITTET, M., TOQUIN, D. Turkey rhinotracheitis in France: preliminary investigations on a ciliostatic virus. **Vet. Rec.**, 119: 606-607, 1986b.
- GIRAUD, P., LE GROS, F.X., TOQUIN, D., BOUQUET, J.F., BENNEJEAN, G. Turkey rhinotracheitis: viral identification of the causal agent. In: **Proceedings of the 37th Western Poultry Disease Conference**, Davis, California, 1988, p. 61-62.
-
- GOATER, E. Das Swollen head syndrome: Vorkommen und Verbreitung in Hühnerbeständen der alten Länder der Bundesrepublik Deutschland, Giessen, Alemanha, Tese de Doutorado, 146 f., 1993.
- GOREN, E. In Een nieuwe ziekte bij de kip: diagnostische bevindingen. **Tijdschr. Diergeneesk.**, 110: 1076-1077, 1985.
- GOUGH, R.E. & COLLINS, M.S. Antigenic relationships of three turkey rhinotracheitis viruses. **Avian Pathol.**, 18: 227-238, 1989.

GOUGH, R.E., MANVELL, R.J., DRURY, S.E.N., PEARSON, D.B. Isolation of an avian pneumovirus from broiler chickens. **Vet. Rec.**, 134:353 – 54, 1994.

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

HABEL, L., SALZMAN, N. P. Methods for the detection of antibodies. **Fundamental Tech. in Virol.**, 28:288-96, 1969.

HAFEZ, H.M. & WEILAND, F. Preliminary studies of a virus associated with turkey rhinotracheitis in West Germany. **Tieraerztl. Umschau.**, 45: 103-111, 1990.

HAFEZ, H.M. Swollen head syndrome : potential risk for broiler and broiler breeders. **Abstracts of the XXVI-th Annual Convention Israel Branch WPSA**, Zichron, Yaacov, 1988, p. 39.

HAFEZ, H.M. Turkey rhinotracheitis : Review and experience in Germany. **Wien. Tieraerztl. Wschr.**, 78: 95-200, 1991.

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

HAFEZ, H.M. Current situation on turkey rinotracheitis and swollen head syndrome. In: **Proceedings of the 43th Western Poultry Disease Conference**. Sacramento, CA, 1994, p. 91-93.

HAFEZ, H.M. & LOERHEN, U. Swollen head syndrome: clinical observations and serology in West Germany. **Tieraerztl. Umschau.**, 97: 322-324, 1990.

HAFEZ, H.M., ARNS, C. W. Desinfection trials on turkeys rhinotracheitis. **Abstract of the XXIV th World Veterinary Congress**, Rio de Janeiro, Brazil, 1991, p.295.

HAFEZ, H.M. Comparative investigation on different turkey rhinotracheitis (TRT) virus isolated from different countries. **Deutsches Tierärztliche Wochenschrift** 99: 486-488, 1992.

HAFEZ, H.M. & WEILAND, F. Isolierung des virus der rhinotracheitis der Puten (TRT). **Tierärztliche Umschau** 45: 103-111, 1990.

HECKERT, R.A., MYERS, D.J., AFSHAR, A., RIVA, J. Development and evaluation of an Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies to Avian Pneumovirus. **Avian Dis.**, 38: 694-70, 1994.

HECKERT, R.A., MYERS, D.J. Absence of antibodies to avian pneumovirus in Canadian poultry. **Vet. Rec.**, 132: 172-176, 1994.

JING, L.; COOK, J. K. A.; BROWN, T. D. K.; SHAW, K. & CAVANAGH, D. Detection of turkeys rhinotracheitis virus in turkeys using the polymerase chain reaction. **Avian Pathol.**, 22:771-83, 1993

JONES, R.C. Avian Pneumovirus infection: questions still unanswered. **Avian Pathol.**, 25: 639-648, 1996.

JONES, P.R., WILLIAMS, R.A., BAXTER-JONES, C., SAVAGE, S.E., WILDING, G.P. Experimental infection of laying turkeys with rhinotracheitis virus: distribution of virus in the tissues and serological response. **Avian Pathol.**, 17: 841-850, 1988.

JONES, R.C., NAYLOR, J.C., BRADBURY, J.M., SAVAGE, C.E., WORTHINGTON, K., WILLIAMS, R.A. Isolation of a turkey rhinotracheitis-like virus from broiler breeder chickens in England. **Vet. Rec.**, 129: 509-510, 1991.

JONES, R.C., NAYLOR, J.C., AL ALFALEQ, A., WORTHINGTONSTON, K.J., JONES, R.
Effect of cyclophosphamide immunosuppression on the immunity of turkey viral rhinotracheitis. **Res. in Vet. Sci.**, 53: 38-41, 1992.

JUHASZ, K., EASTON, A.J. Extensive sequence variation in the attachment (G)-protein gene of avian pneumovirus-evidence for two distinct subgroups. **J.I of Anim. Virol.**, 75: 2873-2880, 1994.

KALETA, E.F. Paramixovirusinfektionen. In: **Krankheiten der Wirtschaftgeflügels**. Herausgeber: HEIDER, G.; MONREAL, G., MESZAROS, J. Ed. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 5: 587-642, 1992.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. **Nature**, 27: 680-685, 1970.

LING, R., PRINGLE, C.R. Turkey rhinotracheitis virus: in vivo and in vitro polypeptide synthesis. **J. Gen. Virol.**, 69: 917-923, 1988.

LOWRY, D.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDAL, R.J. Proteins measurement with the Follin reagent. **J. Biol. Chem.**, 193: 265-275, 1951.

LU, Y.S., SHIEN, Y.S., TSAI, H.J., TSENG, G.S., LEE, S.H., LIN, D.F. Swollen head syndrome in Taiwan isolation of an avian pneumovirus and serological survey. **Avian Pathol.**, 23: 169-174, 1994.

MAJÓ, N., ALLAN, G. M., O'LOAN, C. J., PAGES, A., RAMIS, A. J. A sequential histopathological and immunocytochemical study of chickens, turkey poults and broiler breeders experimentally infected with turkey rhinotracheitis virus. **Avian Dis.**, 39:887-96,1995

- MAJÓ, N., ALLAN, G. M., O'LOAN, C. J., PAGES, A., RAMIS, A. J. Ultrastructural study of turkey rhinotracheitis virus infection in turbinates of experimentally infected chickens. **Vet. Microbiol.**, 52:37-48, 1996
- MASE, M., ASAHII, S., IMAI, K., NAKAMURA, K., YAMAGUCHI, S. Detections of turkey rhinotracheitis virus from chickens with swollen head syndrome by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). **J. of Vet. Med. Sci.** 58, 359-61, 1996.
- MAYR, A., BACHMANN, P.A., BIBRACK, B., WITTMANN, G. Virologische Arbeitsmethoden, Gustav Fischer Verlag, 1974, p. 122-132.
- Mc DOUGALL, J.S., COOK, J.K.A. Turkey rhinotracheitis: Preliminary investigations. **Vet. Rec.**, 118: 206-207, 1986.
- MORLEY, A.J., THOMSON, D.K. Swollen head syndrome in broiler chickens. **Avian Dis.**, 28: 338-343, 1984.
- NAYLOR, C.J., JONES, R.C. Demonstration of a virulent subpopulation in a prototype live attenuated turkey rhinotracheitis vaccine. **Vaccine**, 12: 1225-1230, 1994.
- NICHOLAS, R.A.J., THIRNTON, D.H. The use of the Enzyme-linked-immunosorbent assay in detecting antibodies to avian viruses: a review. **Vet. Bull.**, 56:337-43, 1986
- NUNOYA, T., TAJIMA, M., IZUCHI, TAKAHASHI, K., OTAKI, Y., NAGASAWA, Y., HAKOG, E. Pathology of a broiler disease characterised by the Swollen Head Syndrome. **J. of Vet. Med. Sci.**, 53: 347-49, 1991.
- O'BRIEN, J.D.P. Swollen head syndrome in broiler breeders. **Vet. Rec.**, 117: 619-620, 1985.

- O'LOAN, C.J., CURRAN, W.L., Mc NULTY, M.S. Immunogold labelling of turkey rhinotracheitis virus. **J. of Vet. Med. Brit.**, 39: 459-66, 1992
- O'LOAN, C.J., ALLAN, G.M. The detections of turkey rhinotracheitis virus antigen in formalin fixed paraffin embedded tissue using streptavidin-biotin-immunoperoxidase method. **Avian Pathol.**, 19: 401-407, 1990.
- OTSUKI, A.K., HIRAI, N., MITANI, M., ITANI, 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. **J. of Vet. Med. Sci.**, 58:869-74, 1996.
- PAGES MANTE, A. Resumem del trabajo de investigation llevado a cabo sobre el problema de Cabeza Hinchada em aves. **R. de la Sec. Esp. de la Asoc. Mund. de Avic. Cient.**. 40: 43-45, 1984.
- PATTISON, M., CHETT, N., RANDALL, C.J., WYETH, P.T. Observations on swollen head syndrome in broiler and broiler breeder chickens. **Vet. Rec.**, 125: 229-231, 1989.
- PEARSON, J.E., SENNE, D.A., PANIGRAITY, B., MIXSON, M.A. Viral turkeys rhinotracheitis and swollen head syndrome in chickens: the current status of these diseases in the United States In: **D. E. SWAYNE & M. BOULIANNE (Eds.) Newly: Emerging and Re-emerging Avian Diseases Applied Research and Practical Applications for Diagnosis and Control**, America Association of Avian Pathologists Symposium, Minneapolis, Minnesota, U.S.A., 1993, pp. 78-83.
- PERELMAN, B., MEROZ, M., SAMBERG, Y. Swollen Head-Syndrome in broiler breeders in Israel. **Vet. Rec.**, 123: 444, 1988.
- PICAULT, J.P. Etiology of swollen head syndrome. **Lab. Nat. Path. Aviar.**, B.P. 9, 22440 Ploufragen-France, 1987.

- PICAULT, J.P., GIRAUD, P., DROVIN, P., GUITTET, M., BENNEJEAN, G., LAMANDE, J., TOQUIN, D., GUEGUEN, C. Isolation of a TRTV-like virus from chickens with swollen head syndrome. **Vet. Rec.**, 121: 135, 1987.
- REED, J.L., MUENCH, H.A. A simple method for estimating fifty percent endpoints. **Am. J. Hyg.**, 27: 493, 1938.
- RUSSEL, P.H. & ALEXANDER, D.J. Antigenic variation of Newcastle disease virus strains detected by monoclonal antibodies. **Arch. Virol.**, 75: 243-253, 1983.
- SAN GABRIEL, A. Síndrome da Cabeza Hinchada en aves: Lesions macro y microscopias. **R. de la Sec. Esp. de la Asoc. Mund. de Avic. Cient.**, 40: 46-47, 1984.
- SHAKAL, M., KOCH, G. Development of an immunoperoxidase test for turkey rhinotracheitis serodiagnosis. **Vet. Med. J. Giza**, 43:193-200, 1995.
- SHARMA, J.M. Avian Respiratory Immunity. In: **Proceedings of the 43th Western Poultry Diseases Conference**. Sacramento, CA, 1984, p.55-57.
- SHAPIRO, A.L., VINUELA, E., MAIZEL, J.V. In: WEBER, K., OSBORN, M. Reliability of molecular weight determinations by Dodecyl Sulfate - Polyacrilamide gel electrophoresis. **The J. of Biol. Chem.**, 224 (16), 4406-4412, 1969.
- SILVA, E.N., ARNS, C.W., SILVA J.M.L. Observations on swollen head syndrome in broiler breeder chickens in Brazil. **Arq. Bras. de Med. Vet. e Zoot.** 46(3):210-222, 1994.
- SMITH, A.L., TIGNOR, G.H., MIFUNE, K. Isolation and assay of rabies serogroup viruses in CER cells. **Intervirology**, 8: 92-99, 1977.

STUART, J.E. Turkey rhinotracheitis (TRT) in Great Britain. In: C. NIXEY & T. C. GREY (Eds.) **Recent Adv. in Turkey Sci.**, Buitenworths, London, pp. 217-224, 1989.

SUGAWARA, R.J., CAHOON, B.E., KARU, A.E. Influence of murine macrophage conditioned medium on cloning efficiency, antibody synthesis and growth rate hybridomas. **J. Immunol. Methods**, 79: 263-275, 1985.

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. **J. Vet. Med. Sci.**, 57(5): 939-941, 1995.

TANAKA, M., KOKUMAI, N., OBI, T., HIGASHIHARA, R., TAKUMA, H., HIRAMATSU, K., SHIMIZU, Y. A serological survey of turkey rhinotracheitis virus infection in chicken in Japan. **J. Vet. Med. Sci.**, 58: 689-91, 1996.

TOQUIN, D., ETERRADOSSI, N., GUITTET, M. Use of related ELISA antigen for efficient TRT serological testing following live vaccination. **Vet. Rec.**, 139: 71-72, 1996.

TUNG, A.S., JU, S., SATO, S., NISONOFF, A. Production of large amounts of antibodies in individual mice. **J. Immunol.**, 116: 676-681, 1976.

UBA, União Brasileira de Avicultura – Dados sobre a produção de carne de frango e ovos no Brasil. <http://www.rudah.com.br/uba>. 1997

WILDING, G.P., BAXTER-JONES, C., GRANT, M. Ciliostatic agent found in rhinotracheitis. **Vet. Rec.**, 118: 735, 1986.

WILLIAMS, R.A., SAVAGE, C.E., JONES, R.C. Development of a live attenuated vaccine against turkey rhinotracheitis. **Avian Pathol.**, 20:45-55, 1991.

WYETH, P.J., GOUGH, R.E., CHETTLE, N.J., EDDY, R.K. Preliminary observations of a virus associated with turkey rhinotracheitis. **Vet. Rec.**, 119: 139, 1986.

WYETH, P.I., CHETTLE, N.I., GOUGH, R.E., COLLINS, M.S. Antibodies to TRT in chickens with swollen head syndrome. **Vet. Rec.**, 120: 286-287, 1987.

WYETH, P.J. The rhinotracheitis, swollen head syndrome cause heavy loss. **Poult. Digest**, 49: 16-18, 1990.

ZELLEN, G.K. Case report: swollen-head syndrome in broiler chickens. **Proceedings of the 37th West Poultry Disease Conference**, Davis, California, 1988, p. 139.