



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS

DEPARTAMENTO DE MEDICINA
VETERINÁRIA

Vírus da bursite infecciosa: Desenvolvimento de testes serológicos e moleculares de diagnóstico

Ana Catarina Sá Alves

Orientadora: professora Cristina Queiroga
Coorientador : professor Miguel Fevereiro

Mestrado em Medicina veterinária

Virologia veterinária
Dissertação

Évora, 2018

Esta dissertação inclui as críticas e as sugestões feitas pelo júri



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS

DEPARTAMENTO DE MEDICINA
VETERINÁRIA

Vírus da bursite infecciosa: Desenvolvimento de testes serológicos e moleculares de diagnóstico

Ana Catarina Sá Alves

Orientadora: professora Cristina Queiroga

Coorientador: professor Miguel Fevereiro

Mestrado em Medicina veterinária

Virologia veterinária
Dissertação

Évora, 2018

Esta dissertação inclui as críticas e as sugestões feitas pelo júri



Vírus da bursite infecciosa: Desenvolvimento de testes serológicos e moleculares de diagnóstico

Índice

Índice de figuras.....	VI
Índice de tabelas.....	IX
Agradecimentos	X
Abreviaturas.....	XI
Resumo	XIII
Abstract.....	XIV
1.Introdução	15
1.1.Propriedades do vírus	16
1.1.1. Características físicas e químicas	16
1.2.Propriedades antigénicas.....	19
1.3.Crescimento e multiplicação.....	20
1.4.Patogénese	22
1.5.Sinais clínicos	24
1.6.Diagnóstico	25
1.6.1.RT-PCR e RT-qPCR	26
1.6.2.Teste ELISA indireto.....	29
1.6.3.Proteínas recombinantes	31
2.Objetivos.....	35
3.Metodologias de diagnóstico de birnavírus nas aves	37
3.1.Materiais e métodos	37
3.1.1.Isolamento, multiplicação e identificação de vírus em cultura de células e em ovos embrionados	37
3.1.1.1.Isolamento e multiplicação de birnavírus	37
3.1.1.2.Inoculação de ovos embrionados de galinha	37
3.1.1.3.Multiplicação do IBDV em cultura de células FEPI	39
3.1.1.4.Inoculação de células FEPI com IBDV	43
3.1.1.5.RT-PCR e RT-qPCR para deteção de e birnavírus	43
3.1.1.5.1.Amplificação por RT-PCR	44
3.1.1.5.2.Amplificação por RT-PCR com reação RT realizada separadamente.....	45
3.1.1.5.3.Amplificação por RT-qPCR	46
3.1.2.Deteção de anticorpos anti-IBDV pelo método ELISA indireto	48

3.2.Resultados.....	50
3.2.1.Isolamento, multiplicação e identificação de vírus em cultura de células e em ovos embrionados	50
3.2.1.1.Isolamento de birnavírus.....	50
3.2.1.2.Inoculação de células FEPI com IBDV	51
3.2.1.3.RT-PCR e RT-qPCR para deteção de birnavírus.....	54
3.2.1.3.1.Amplificação por RT-PCR	54
3.2.1.3.2.Amplificação por RT-PCR com RT separadamente.....	55
3.2.1.3.3.Amplificação por RT-qPCR	56
3.2.2.Deteção de anticorpos anti-IBDV pelo método ELISA indireto	58
3.3.Discussão	61
4.Expressão e purificação da proteína VP2 em <i>E. coli</i>	64
4.1.Materiais e métodos	66
4.1.1.Amplificação do gene vp2 de uma estirpe do IBDV isolada em Portugal	66
4.1.2.Clonagem, transformação e seleção de clones recombinantes	68
4.1.3.Clonagem em vetor de expressão	70
4.1.4.Produção e purificação de proteína recombinante.....	72
4.1.5.Análise da proteína recombinante	73
4.2.Resultados e discussão.....	76
4.2.1.Amplificação do gene vp2 do IBDV	76
4.2.2.Clonagem do gene vp2 truncado (vp2t)	77
4.2.3.Clonagem em vetor de expressão	78
4.2.4.Análise da proteína recombinante	81
5.Conclusão.....	85
Bibliografia	86

Índice de figuras

Figura 1 - Estrutura da partícula viral do IBDV	16
Figura 2 – Estrutura da partícula viral do IBDV	17
Figura 3- Diagrama de uma partícula infecciosa do IBDV	18
Figura 4 - Replicação viral de vírus dsRNA	20
Figura 5- Esquema de replicação de vírus dsRNA	20
Figura 6- Esquema representativo do qPCR - interação entre FAM e TAMRA	28
Figura 7- Esquema de funcionamento do teste ELISA indireto para IBDV	30
Figura 8- Diagrama ilustrativo da transcrição e tradução.	31
Figura 9- Esquema representativo da migração de proteínas de diferentes tamanhos no gel de poliacrilamida	34
Figura 10- Ovos embrionados de galinha com 6 dias de incubação preparados para a inoculação das amostras 39990-2017 e 1042-2010	38
Figura 11 - Colheita de órgãos, fígado, de embrião de pinto na camara de fluxo laminar	42
Figura 12 – Filtração do macerado com funil e gaze esterilizados, na camara de fluxo laminar	42
Figura 13 - Termociclador de tampa aquecida UNO II (Biometra) utilizado no RT-PCR	45
Figura 14 –Amostra de animais testados	48
Figura 15 - Embrião morto após inoculação com birnavírus, com lesões típicas	50
Figura 16 -Fígados de embriões afetados, com lesões de birnavírus	50
Figura 17 - Imagem microscópica obtida por contraste de fase do tapete celular completo – células FEPI não inoculadas	51
Figura 18 - Imagem microscópica do efeito citopático observado 48h após a inoculação com o isolado 39990-2017	52
Figura 19- Imagem microscópica, obtida por contraste de fase, do efeito citopático de birnavírus (setas pretas) observado 72h após a inoculação com o isolado 39990-2017... ..	52
Figura 20 - Imagem microscópica, obtida por contraste de fase, de efeito citopático de birnavírus (setas amarelas) observado 48h após a inoculação com o isolado 1042-2010	54

Figura 21 - Análise eletroforética de produtos amplificados por RT-PCR utilizando os primers P3 e P4	55
Figura 22- Análise eletroforética de produtos amplificados por RT-PCR com RT separadamente utilizando os primers P3 e P4	56
Figura 23– Amplificação por RT-qPCR utilizando os primers P3 e P4 e a sonda FAM, dos isolados 1042-2010 obtidos a partir de cultura de células e de um macerado de órgãos (BF e fígado) de embriões inoculados com o isolado 39990-2017.	57
Figura 24- Gráfico representativo dos resultados relativos às galinhas reprodutoras	58
Figura 25- Gráfico representativo dos resultados relativos às galinhas poedeiras	58
Figura 26- Gráfico representativo dos resultados relativos aos frangos do campo	59
Figura 27 - Gráfico representativo dos resultados relativos aos patos de engorda	59
Figura 28- Diagrama demonstrativo da inserção do produto amplificado no vetor Pcr 2.1	65
Figura 29 - Passagem das colónias para frascos com meio LB e kanamicina.	69
Figura 30 - Esquema representativo do vetor pET-28a(+).	71
Figura 31 - Esquema representativo do vetor pET-vp2t, resultante da clonagem do gene vp2t no vetor pET-28 ^a (+)	72
Figura 32- Preparação do separating gel a 12% – SDS-Page.....	74
Figura 33- Eletroforese a 200V, 50 minutos do gel de poliacrilamida.....	75
Figura 34 - Análise eletroforética do produto de amplificação, por RT-PCR, do gene vp2 com os primers IBDV-vp2t-F-Eco, IBDV-vp2t-R-Xho e IBDV-vp2t-F-Eco, IBDV-vp2t-R-Eco	76
Figura 35 - Colónias azuis em células XLGold (E. coli) com o plasmídeo Pcr 2.1 -vp2t	77
Figura 36- Análise eletroforética das amostras de pDNA, obtido a partir das células XLGold (E.coli), digeridas com a enzima EcoRI e XhoI.	78
Figura 37- Análise eletroforética dos produtos de purificação das bandas correspondente ao gene vp2t e ao vetor pET-28 ^a (+), avaliação da intensidade das bandas correspondentes ao gene vp2t e ao vetor pET-28 ^a (+)	79
Figura 38- Colónias brancas (JM109 – E.coli) com o vetor pET-vp2t	79
Figura 39- Análise eletroforética as amostras de pDNA, obtido em células XLGold (E.	

coli), digeridas com a enzima Eco0109I.	80
Figura 40- Sequência do gene vp2t clonado no vetor pET-28a(+) obtida pelo método enzimático de Sanger, com os primers universais para o vetor pET-28a(+) T7 promoter e T7 terminator e os primers de diagnóstico para o IBDV P3 e P4.	81
Figura 41- Fotografia do gel de poliacrilamida, SDS-Page após eletroforese corado pela prata para análise da proteína purificada a partir dos corpos de inclusão das células de expressão JM109	82
Figura 42- Fotografia com filtro UV do gel de poliacrilamida após eletroforese corado pela prata para análise da proteína purificada a partir dos corpos de inclusão das células de expressão JM109.....	83
Figura 43 - Fotografia com filtro UV do gel de poliacrilamida, SDS-Page, (gel de separação 12% e gel de concentração 4%), após eletroforese (200V, 50 min.) corado pela prata para análise da proteína purificada a partir dos corpos de inclusão das células de expressão JM109.....	84



Índice de tabelas

Tabela 1- Função das proteínas virais do IBDV.....	18
Tabela 2- Subgrupos antigénicos do serotipo I do IBDV	19
Tabela 3 - Constituição dos meios de cultura e as suas funções (Zavattieri, 2003).....	40
Tabela 4 - Amostras utilizadas em cada método de amplificação	44
Tabela 5 - Reagentes utilizados na reação de transcrição reversa	46
Tabela 6 - Reagentes utilizados no RT-qPCR	47
Tabela 7- Condições da reação de transcrição reversa	66



Agradecimentos

Muito obrigada a todos os que me apoiaram neste trabalho e que contribuíram para a finalização do mesmo.

Especial obrigado ao professor Miguel Fevereiro, meu coorientador, pela contribuição humana e académica, paciência e por todo o conhecimento que me transmitiu, pelas aulas mais interativas que já tive que me despertaram o interesse na área da virologia. À professora Cristina Queiroga especial agradecimento pela paciência, orientação neste trabalho mesmo quando me sentia perdida, e disponibilidade em ensinar-me sempre o melhor.

À doutora Margarida Mourão e Dr. Tiago Luís, pela orientação dentro do laboratório e disponibilidade em ajudar sempre que precisava.

A toda a equipa do INIAV, muito obrigada pela calorosa receção e toda a ajuda e orientação ao longo do estágio.

Às minhas irmãs, Joana e Inês, por me incentivarem nos momentos em que achava que não ia terminar o trabalho.

À minha mãe por me proporcionar tudo isto.

Abreviaturas

AGID – Imunodifusão em agarose

BF – Bolsa de Fabricius

cDNA- DNA complementar

Cf – Concentração final

DNA – Ácido desoxirribonucleico

dNTPs - Desoxirribonucleotídeos fosfatados

DO – Densidade ótica

dsRNA – RNA de cadeia dupla

EC – Efeito citopático

ELISA - *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (Ensaio de imunoabsorção enzimática)

FAM - 6 – carboxifluoresceína

FEPI - Fígado de embrião de pinto

hvVP2 - Zona hipervariável da VP2

IBD - *Infectious Bursal Disease* (bursite infecciosa)

IBDV – *Infectious Bursal Disease Virus* (Vírus da bursite infecciosa)

IMAC – *Immobilized metal affinity chromatography* (Cromatografia de afinidade)

LB - *Luria Broth*

LMH - *Chicken Liver Hepatocellular carcinoma* (Carcinoma hepatocelular de galinha)

mRNA – RNA mensageiro

PAGE – *Polyacrylamide gel electrophoresis* (Eletroforese em gel de poliacrilamida)

PBS - *Phosphate-Buffered Saline* (tampão fosfato salino)

PCR - *Polymerase Chain Reaction* (reação em cadeia da polimerase)

pDNA – DNA plasmídico

RNA – Ácido ribonucleico

RT – Transcriptase reversa

RT-PCR - *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction* (transcrição reversa reação em cadeia da polimerase)

RT-qPCR – *Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction* (PCR em tempo real)



SDS – *Sodium dodecyl sulfate* (dodecil sulfato de sódio)

SDS-PAGE - *Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (dodecil sulfato de sódio eletroforese em gel de poliacrilamida)

SPF - *Specific pathogen free* (livres de agentes patogénicos específicos)

TAMRA - 6 - carboxi-tetrametilrodamina

TAE - Tampão Tris-Acetato-EDTA

TL – Tampão de lise

TMB - *Tetramethylbenzidine* (Tetrametilbenzidina)

VERO - *African green monkey kidney* (rim de macaco)

VP – Proteína viral

Resumo

A bursite infecciosa, ou doença de Gumboro é causada por um birnavírus que origina mortalidade e imunossupressão principalmente em frangos. O vírus da IBD (IBDV) é um vírus nú, com genoma bi-segmentado de RNA de cadeia dupla. Na proteína viral VP2 estão presentes epitópos responsáveis pela indução de anticorpos neutralizantes no hospedeiro. As alterações de aminoácidos que ocorrem na região variável da VP2 induzem variações no reconhecimento de anticorpos, antigenicidade, imunogenicidade, virulência e tropismo do IBDV. Existem dois serotipos de IBDV, mas apenas os vírus do serotipo I são patogénicos para as galinhas. O vírus afeta a proliferação e a diferenciação dos linfócitos B, o que leva a uma imunossupressão, aumenta a suscetibilidade da galinha a infeções secundárias, e interfere nas respostas à vacinação. A rápida transmissão destes vírus e os elevados prejuízos económicos que causam justificam o desenvolvimento de métodos de diagnóstico expeditos capazes de os detetar e diferenciar.



Infectious bursal disease virus: Development of serological and molecular diagnostic tests

Abstract

Infectious bursal disease (IBD) is caused by a virus that causes mortality and immunosuppression especially in chickens. This is a naked virus with bi-segmented genome of double-stranded RNA. The viral protein VP2 owns epitopes responsible for the induction of neutralizing antibodies in the host. Amino acid changes occurring in the VP2 variable region may lead to variations in antibody recognition as well as antigenicity, immunogenicity, virulence and tropism of IBDV. To date, two IBDV serotypes have been identified, however only serotype I viruses are pathogenic to chickens. The bursa of Fabricius is the target organ of IBDV. The virus affects the proliferation and differentiation of B lymphocytes, which leads to age-dependent immunosuppression, increases the chicken susceptibility to secondary infections and interferes with vaccination responses. The rapid transmission of these viruses and the high economic losses they cause justify the development of diagnostic methods capable of detecting and differentiating these viruses.

1. Introdução

A doença de Gumboro ou bursite infecciosa (*Infectious Bursal Disease – IBD*) tem como agente etiológico um birnavírus pertencente ao género *Avibirnavirus*, família *Birnaviridae*. O vírus foi reconhecido como agente da doença no distrito de Gumboro, em Delaware, EUA, em 1962 por A. S. Cosgrove, o que deu origem ao nome da mesma (Hussein et al., 2014).

A doença de Gumboro é uma doença aguda, altamente contagiosa que afeta principalmente galinhas jovens com menos de 6 semanas de idade, provocando uma imunossupressão severa, podendo mesmo levar à morte das mesmas (Lee et al., 2015). O vírus afeta principalmente a bolsa de Fabricius, este órgão cresce rapidamente nas primeiras 3 semanas de vida e começa a sua involução por volta das 12 semanas de idade, ficando esta completa por volta das 20 semanas.

O vírus está distribuído a nível mundial, e esta é uma doença com elevada importância económica, na medida em que é altamente contagiosa e causa imunossupressão nos animais afetados (Lawal et al., 2017).

Entre 1960 e 1964 a doença afetou muitas regiões dos EUA, e chegou à Europa entre 1962 e 1971. Entre 1966 e 1974 a doença foi identificada no Médio Oriente, África Ocidental e do Sul, Índia, Extremo Oriente e Austrália. Numa pesquisa orientada pela OIE em 1995, 95% dos 65 países que participaram declararam casos de infeção, inclusive a Nova Zelândia, país livre da doença até 1993 (Ven den berg et al., 2000).

Em Portugal, a doença tem um impacto económico negativo principalmente a nível da produção de carne de frango. O impacto da doença nas galinhas poedeiras e reprodutoras apresenta maior gravidade, no entanto apresenta uma taxa de ocorrência baixa (MSD, 2006).

1.1. Propriedades do vírus

1.1.1. Características físicas e químicas

O vírus da bursite infecciosa (*Infectious bursal disease virus* - IBDV) é um vírus nu, com genoma bi-segmentado linear de RNA de cadeia dupla (dsRNA): 2 segmentos (A e B) que codificam para 5 proteínas. O tamanho dos segmentos é cerca de 2,9 a 3 kbp. O tamanho total do genoma é cerca de 6 kbp. Este vírus apresenta simetria icosaédrica T=13 e diâmetro de cerca de 70 nm, sendo composto por 260 trímeros da proteína VP2 que formam picos que se projetam radialmente a partir da cápside (Fig 1).

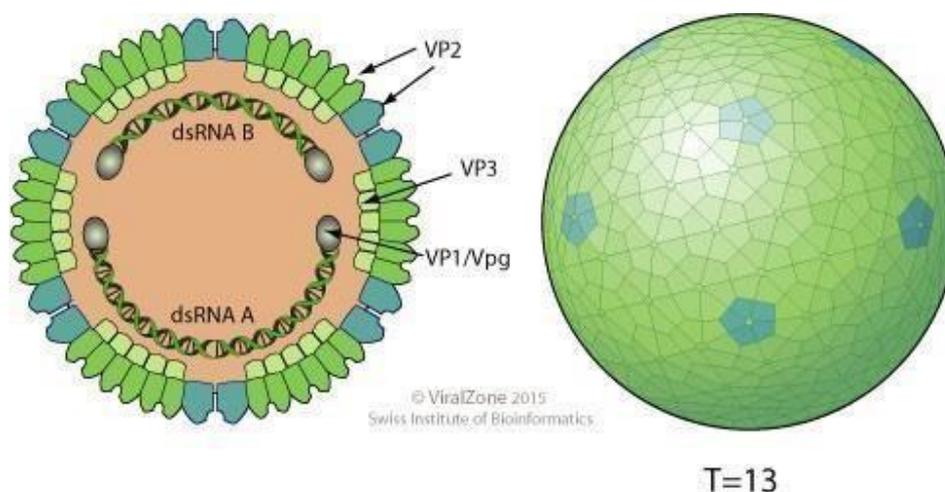


Figura 1 - Estrutura da partícula viral do IBDV (ExPAZy, 2015)

O segmento de maiores dimensões do ácido nucleico, A, codifica quatro proteínas estruturais, a proteína VP5 e uma poliproteína de aproximadamente 110 kDa, que é autoclivada para formar as proteínas virais VP2, VP3 e VP4, além de quatro péptidos estruturais que derivam do precursor da VP2, pVP2. O segmento de menores dimensões, B, codifica a proteína viral VP1, uma RNA polimerase dependente de RNA, que está presente no interior da cápside viral e que se liga às cadeias simples de RNA (Amin & Jackwood, 2014; Rani & Kumar, 2015) (Fig.2 e 3).

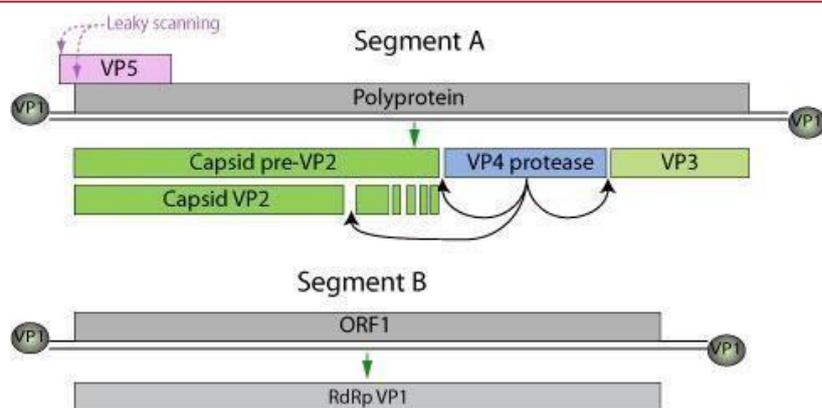


Figura 2- Estrutura da partícula viral do IBDV (ExPAZy, 2015)

Podem considerar-se como de maior importância duas proteínas virais, a VP2 e a VP3. A proteína viral VP2 é a maior proteína estrutural da cápside, seguindo-se a VP3. A VP2 contém a maioria dos locais antigénicos responsáveis pela indução de anticorpos neutralizantes, e é o maior antígeno do vírus. Esta proteína tem também um papel importante no tropismo celular e variação antigénica. O domínio variável da VP2 é muito propício a mutações que poderão estar associadas a alterações na sequência de aminoácidos responsável pela base molecular da variação antigénica, e adaptação a culturas de células. A proteína VP3, também uma proteína estrutural, mas da porção interna da cápside viral, contém alguns determinantes antigénicos específicos e um local antigénico responsável pela indução de anticorpos neutralizantes, ainda que de menor importância em relação à VP2 (Dubovi, 2011a) (Tab.1).

A proteína viral VP5 tem um papel importante na disseminação do vírus a partir de células infetadas, inibindo a apoptose celular nas fases iniciais da infeção e induzindo diminuição da viabilidade celular, na fase mais tardia da infeção viral. A proteína VP4 atua como uma protease que cliva parte do segmento A em VP2, VP4 e VP3 (Taghavian et al., 2013; Rani & Kumar, 2015).

O IBDV é um vírus muito resistente, estável na presença de desinfetantes, uma vez que é um vírus nu. É termoestável e resistente à exposição a pH 3,0, éter e clorofórmio.

Sobrevive quando submetido a temperaturas da ordem dos 60 °C durante 60 minutos (Dubovi, 2011a; Rani & Kumar, 2015; Wang et al., 2017).

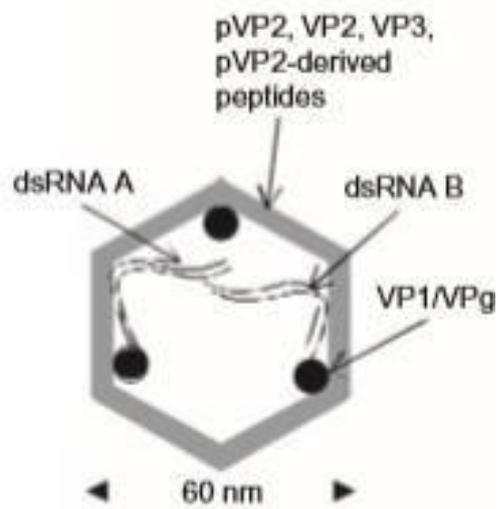


Figura 3- Diagrama de uma partícula infecciosa do IBDV (Dubovi, 2011a)

Tabela 1- Função das proteínas virais do IBDV

	<i>Função</i>
<i>VP2</i>	Indução de anticorpos neutralizantes
<i>VP3</i>	Indução de anticorpos neutralizantes
<i>VP4</i>	Clivagem do segmento A em VP2, VP3 e VP4
<i>VP5</i>	Disseminação do vírus; diminuição da viabilidade celular
<i>VP1</i>	RNA polimerase dependente de RNA (RdRp)

1.2. Propriedades antigénicas

Conhecem-se dois serotipos do vírus: I e II. Os vírus do serotipo I são patogénicos para as galinhas, enquanto que os do serotipo II não são. O serotipo I apresenta três subgrupos antigénicos, com virulência variável: estirpes clássicas; estirpes variantes e estirpes muito virulentas. As estirpes clássicas do IBDV provocam danos na bolsa de Fabricius e necrose linfoide, com uma mortalidade associada de 20-30%. As estirpes variantes não causam mortalidade nas galinhas, enquanto que as muito virulentas têm uma mortalidade associada de 50-100%, sendo responsáveis por lesões graves na bolsa de Fabricius, baço, timo e medula óssea (Tab.2) (Dubovi, 2011a). Pode considerar-se ainda um outro subgrupo antigénico: estirpes atenuadas, que têm bastante utilidade no desenvolvimento de vacinas. As estirpes muito virulentas circulam apenas na Europa, África, Ásia e América do Sul. Enquanto que as estirpes clássicas e variantes têm uma distribuição mundial (Dubovi, 2011a; Rani & Kumar, 2015).

As infeções assintomáticas com vírus do serotipo II têm sido descritas em galinhas e perus. A presença de anticorpos anti serotipo II do IBDV no soro de aves assintomáticas de outras espécies tem sido raramente descrita, estas infeções são insignificantes para a ecologia e epidemiologia do vírus. Não existe até ao momento evidência de dano para a saúde pública provocados por este vírus (Dubovi, 2011a; Rani & Kumar, 2015).

Tabela 2- Subgrupos antigénicos do serotipo I do IBDV

<i>Serotipo I</i>	
<i>Estirpes clássicas</i>	Necrose linfoide na bolsa de Fabricius; mortalidade 20-30%
<i>Estirpes variantes</i>	Sem mortalidade associada
<i>Estirpes muito virulentas</i>	Lesoes graves na bolsa de Fabricius, baço, timo e medula óssea; mortalidade 50-100%

1.3. Crescimento e multiplicação

O vírus da bursite infecciosa replica em células de galinha e também em células de mamífero, contudo as estirpes altamente patogênicas podem ser difíceis de isolar e cultivar. A replicação dos birnavírus ocorre no citoplasma da célula sem afetar de forma significativa o RNA celular ou a síntese proteica. O RNA mensageiro (mRNA) viral é transcrito por uma RNA polimerase dependente de RNA associada ao virião (transcriptase – VP1) (Dubovi, 2011a) (Fig.4 e 5).

Penetração do vírus no citoplasma da célula.

Transcrição do genoma dsRNA pela polimerase viral no interior do virião (dsRNA não é exposto ao citoplasma da célula) → esta cadeia é posteriormente utilizada como *template* para a tradução.

Cadeias de RNA + são encapsidadas em partículas virais, onde são transcritas para originar moléculas de RNA -, com as quais emparelham para produzir genomas de dsRNA.

Viriões maduros saem da célula por *budding*.

Figura 4 - Replicação viral de vírus dsRNA (adaptado (ExPAZy, 2015))

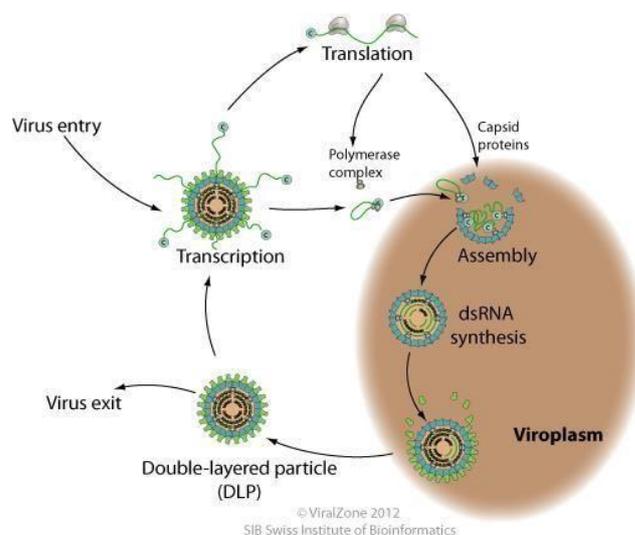


Figura 5- Esquema de replicação de vírus dsRNA (ExPAZy, 2015)

O crescimento do IBDV pode ser feito em ovos embrionados livres de agentes patogênicos específicos (*specific pathogen free - SPF*) com seis a onze dias de incubação, dependendo da via de inoculação dos ovos. A inoculação na membrana coro-alantoide (CAM) ou através do saco vitelino são as melhores vias. A morte do embrião ocorre três a sete dias após a inoculação. Os embriões afetados pelo vírus podem surgir edematosos, congestionados, com uma aparência gelatinosa da pele, e hemorragias estão frequentemente presentes. As membranas embrionárias normalmente não se encontram afetadas. Entre os diferentes compartimentos do ovo inoculado, o embrião é o local onde são encontrados os títulos de vírus mais elevados. O fígado pode apresentar petéquias difusas e focos de necrose, sendo o órgão com maior concentração de partículas virais (Venden berg et al., 2000).

A adaptação bem-sucedida de isolados de IBDV em fibroblastos, rim e bolsa de Fabricius de embriões de pinto está descrita, contudo as células primárias têm uma vida útil limitada, produzem títulos virais baixos e podem conter outros vírus aviários. Muitas linhas celulares de mamíferos podem ser usadas no crescimento de isolados de IBDV incluindo OK (*opossum kidney cells*), BGM-70 (*buffalo green monkey kidney cells*), células VERO (*African green monkey kidney*), BK-13 (Lawal et al., 2017). As linhas celulares são de mais fácil manutenção e livres de contaminantes virais. Vários níveis de títulos virais foram obtidos usando estas linhas celulares, tornando-as numa melhor escolha para o crescimento e propagação do IBDV, especialmente quando são necessários títulos elevados, como para os casos de produção de vacinas (Lawal et al., 2017).

1.4. Patogénese

O órgão mais afetado pelo IBDV é a bolsa de Fabricius, principal reservatório de linfócitos B nas aves. As células alvo são os linfócitos B em divisão ativa.

Após a infecção por via oral, o vírus replica-se inicialmente nos macrófagos e linfócitos ao nível do ceco e intestino delgado (primeiras 4 a 5 horas), entra na circulação portal, instalando-se assim a primeira virémia. Aproximadamente 11 horas após a infecção, o vírus encontra-se presente nos linfócitos da bolsa de Fabricius, onde é produzido e libertado em grandes quantidades, resultando numa segunda virémia, nesta fase o vírus pode localizar-se noutros tecidos, como outros tecidos linfoides (Dubovi, 2011a). Os animais afetados surgem com desidratação severa, podendo observar-se hemorragias nos músculos peitorais e nas coxas, possivelmente devido a distúrbios na coagulação (Ven den berg et al., 2000). Uma característica da patogénese da bursite infecciosa é a replicação seletiva na bolsa de Fabricius, que nas fases iniciais da infecção (3 a 4 dias após a exposição ao agente causal), vai surgindo aumentada até cinco vezes o seu tamanho normal, edematosa, hiperémica e com estrias longitudinais proeminentes. Os folículos linfoides deste órgão colapsam como consequência da destruição linfocitária, devido à necrose e apoptose induzidas pelo vírus e, nas aves que sobrevivem, o órgão pode estar quase desprovido de linfócitos (Dubovi, 2011a).

A bolsa de Fabricius tem um papel fundamental na patogénese da doença, uma vez que aves onde se efetuou a remoção cirúrgica do órgão sobreviveram à infecção, muitas vezes sem desenvolverem sinais clínicos de doença. Estirpes de vírus muito virulentas também provocam uma diminuição das células no timo, baço e medula óssea. As hemorragias ocorrem sob a serosa, e surgem focos necróticos ao longo de todo o parênquima da bolsa de Fabricius. Aquando da morte, a bolsa de Fabricius pode apresentar-se necrótica, e os rins com tamanho aumentado devido à acumulação de uratos secundária à desidratação (Dubovi, 2011a).

A imunossupressão causada pela doença é um processo complexo. Por um lado a massiva depleção de linfócitos B durante a infecção do hospedeiro, destrói o repertório de linfócitos, então o sistema imunitário falha na resposta a outros agentes patogénicos. Durante a infecção por IBDV ocorre uma rápida perda de linfócitos B na bolsa de Fabricius, assim como um elevado nível de apoptose a nível dos linfócitos periféricos. Apesar da apoptose



ser um mecanismo de defesa do hospedeiro contra a invasão viral, uma vez que a apoptose de células infectadas limita a replicação e expansão viral, no caso da que ocorre numa situação de infecção por IBDV parece ser iniciada e manipulada pelo próprio vírus, pois contribui para a libertação do vírus numa fase mais tardia do seu ciclo (Qin & Zheng, 2017; He et al., 2017)

1.5. Sinais clínicos

Os sinais clínicos da bursite infecciosa são mais severos em aves com 3-6 semanas de idade, período em que a Bolsa de Fabricius, órgão alvo do vírus, atinge o seu maior desenvolvimento. Aves com menos de 3 semanas de idade apresentam infecções subclínicas, muito devido ao número limitado de pré-linfócitos B, ou devido à presença de anticorpos maternos. Por outro lado, aves com mais de 6 semanas de idade, raramente desenvolvem sinais clínicos, apesar de produzirem anticorpos contra o vírus. No entanto quando se trata de estirpes muito virulentas o período de suscetibilidade das aves aumenta, podendo abranger todo o período de crescimento (Dubovi, 2011a).

O período de incubação é curto: 2-3 dias. Após este período, e numa fase aguda, os animais apresentam depressão, anorexia, incoordenação, desidratação. A manifestação clínica da doença tem uma duração de cerca de 3-4 dias, após o que os animais que sobrevivem recuperam relativamente rápido, contudo a imunossupressão pode persistir, aumentando a suscetibilidade a outros agentes virais ou a bactérias. A mortalidade pode surgir 3-4 dias após a infeção, atinge o seu pico máximo por volta do 4º dia pós-infeção. Os animais que sobrevivem a esta fase, recuperam para um aparente estado saudável em aproximadamente 7 dias (Ven den berg et al., 2000).

O vírus é excretado nas fezes das aves infetadas durante cerca de 2-14 dias. A transmissão ocorre por contato direto ou via oral. A doença assume maior severidade quando o vírus é introduzido num bando não infetado. Por outro lado, se a doença se torna enzoótica ou se os animais são vacinados, assume um curso mais suave e a sua propagação é mais lenta. A gravidade que a doença assume depende da idade e da sensibilidade das aves infetadas, da virulência da estirpe viral e da imunidade passiva dos animais. A infeção inicial numa determinada exploração normalmente é muito aguda, com taxas de mortalidade associadas muito elevadas se estiver envolvida uma estirpe muito virulenta. No caso de o vírus persistir na exploração e ser transmitido para as populações descendentes, as formas clínicas da doença surgem mais cedo e vão sendo substituídas por formas subclínicas. Podem, contudo, surgir formas agudas. Para além disto, uma infeção primária pode ser inaparente caso a estirpe viral seja de baixa virulência ou se os anticorpos maternos estiverem presentes (Ven den berg et al., 2000).

1.6. Diagnóstico

O diagnóstico clínico é possível, no entanto difícil. Nas formas agudas da doença surgem sinais clínicos pouco específicos, contudo a observação de lesões *post mortem* patognomónicas, permite direccionar o diagnóstico para um caso de bursite infecciosa, não descartando posteriores testes moleculares e serológicos para confirmação. Uma vez que os sinais clínicos são pouco específicos, esta é uma doença facilmente confundível. Como tal surgem como diagnóstico diferencial a doença de Newcastle, anemia infecciosa, coccidiose, micotoxicozes, formas nefropatogénicas de bronquite infecciosa, doença de Marek nos casos subclínicas quando há atrofia da bolsa de Fabricius (Ven den berg et al., 2000; Frasca et al., 2004).

O vírus pode ser detetado na fase aguda da doença. O isolamento de vírus em ovos embrionados e observação de lesões no embrião é uma das formas de diagnóstico. Antígenos virais podem ser detetados por imunofluorescência direta em amostras de bolsa de Fabricius de aves afetadas. A partir de suspensões de bolsa de Fabricius podem, também, ser detetados antígenos virais, recorrendo a testes como a imunodifusão em agarose (AGID) ou o ensaio de imunoabsorção enzimática (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay* – ELISA) em *sandwich*.

O uso de técnicas moleculares de diagnóstico para deteção e identificação de estirpes de IBVD tem vindo a aumentar. A transcrição reversa reação em cadeia da polimerase (RT-PCR - *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*) é usado para amplificar secções genómicas do IBVD. O gene vp2 é o mais estudado, uma vez que codifica a maior parte dos epitopos responsáveis pela indução de defesas no hospedeiro, contém determinantes de virulência, e é altamente variável entre as várias estirpes. Para além disto, a região hipervariável (hvvp2) do IBVD pode ser utilizada para diferenciação molecular de estirpes do vírus (Ven den berg et al., 2000).

A deteção de anticorpos é um método que poderá ser utilizado, no entanto é difícil fazer a distinção entre anticorpos induzidos por estirpes patogénicas e por estirpes vacinais, como tal tem pouco interesse em zonas endémicas. Por outro lado, a quantificação de anticorpos anti-IBVD é importante para controlo da profilaxia médica, na medida em que permite avaliar o título de anticorpos passivos e, ainda, determinar se a vacinação foi bem efetuada. Os testes AGID, ELISA e seroneutralização em cultura de células são os mais utilizados

na quantificação de anticorpos. Sendo o teste ELISA o mais rápido e sensível, é o mais usado.

1.6.1. RT-PCR e RT-qPCR

O diagnóstico virológico do IBDV, por RT-PCR, envolve 3 etapas: i) extração de RNA a partir de macerados de órgãos ou de cultura de células inoculadas; ii) desnaturação do RNA de cadeia dupla e a sua transcrição reversa em DNA; iii) amplificação por PCR. O RT-PCR é utilizado para caracterizar a expressão génica em vários tipos de tecidos e tipos de células ou na deteção de RNA viral. Associa uma reação de transcriptase reversa, utilizando a enzima transcriptase reversa (RT), para gerar várias cópias de DNA complementar (cDNA) a partir de RNA viral, seguida de uma reação amplificação do cDNA por PCR (Bachman, 2013).

A reação PCR consiste numa série de ciclos divididos em 3 etapas. A desnaturação que consiste na separação das cadeias duplas de DNA. A segunda etapa, o *annealing*, que consiste no emparelhamento dos *primers* com as cadeias de DNA desnaturadas. Na última etapa, a extensão, ocorre a síntese de DNA.

Os *primers* são cadeias simples de DNA, curtas e sintetizadas artificialmente, com cerca de 18 a 25 nucleótidos que emparelham no início e no fim do fragmento de DNA a ser amplificado. Os parâmetros a ter em conta na construção dos *primers* são a temperatura de fusão a sua constituição (nucleótidos). A temperatura de fusão de um *primer* é definida como a temperatura a que metade dos locais de ligação do mesmo estão ocupados, e esta depende do tamanho do *primer* e da sua constituição. A constituição ideal de um *primer* é entre 18 a 25 nucleótidos com uma temperatura de fusão entre 55°C e 60 °C. Após o emparelhamento dos *primers*, inicia-se a etapa de extensão. Nesta etapa, sob ação da enzima Taq polimerase, ocorre a síntese de duas novas cadeias de DNA obtidas pela incorporação de desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTPs), utilizando como moldes as cadeias a que os *primers* se ligaram. A Taq polimerase é uma enzima termoestável que provém de uma bactéria termófila, *Thermus aquaticus*. A temperatura ótima de atividade da enzima é de 72 °C, não sendo muito afetada pela temperatura de desnaturação (94-95°C) utilizadas nas reações PCR (Videira, 2001; Xivn et al., 2016).

O método de PCR em tempo real (*Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction* - RT-qPCR) tem a vantagem de permitir a detecção da amplificação do cDNA nas fases iniciais da reação. Esta detecção é realizada por uma sonda (*probe*) marcada com um fluorocromo nas extremidades 5' (ex.: FAM: 6 - carboxifluoresceína) e 3' (ex.: TAMRA:6 - carboxi-tetrametilrodamina). As sondas são desenhadas de modo a emparelhar com uma zona interna da região a amplificar. Deste modo durante a amplificação se a sequência alvo da sonda estiver presente, esta liga-se a uma região do

DNA alvo flanqueada pelos *primers*, sendo clivada pela atividade exonuclease da 5' Taq polimerase aquando da extensão do *primer*. A clivagem da sonda separa o TAMRA (que extingue a fluorescência emitida por FAM) do FAM, havendo assim emissão de fluorescência, que é detetada no termociclador, e contabilizada em CTs (*threshold cycle*). Quanto menor o CT maior o número de cópias iniciais de DNA. Caso não exista a sequência de DNA reconhecida pela sonda, não ocorre o emparelhamento entre a sonda e o DNA e, portanto, a clivagem pela Taq polimerase não ocorre. Mantendo-se a sonda intacta o fluorocromo FAM permanece junto do TAMRA, não havendo, por esse motivo, fluorescência emitida por FAM (Cient et al., 2016) (Fig.6).

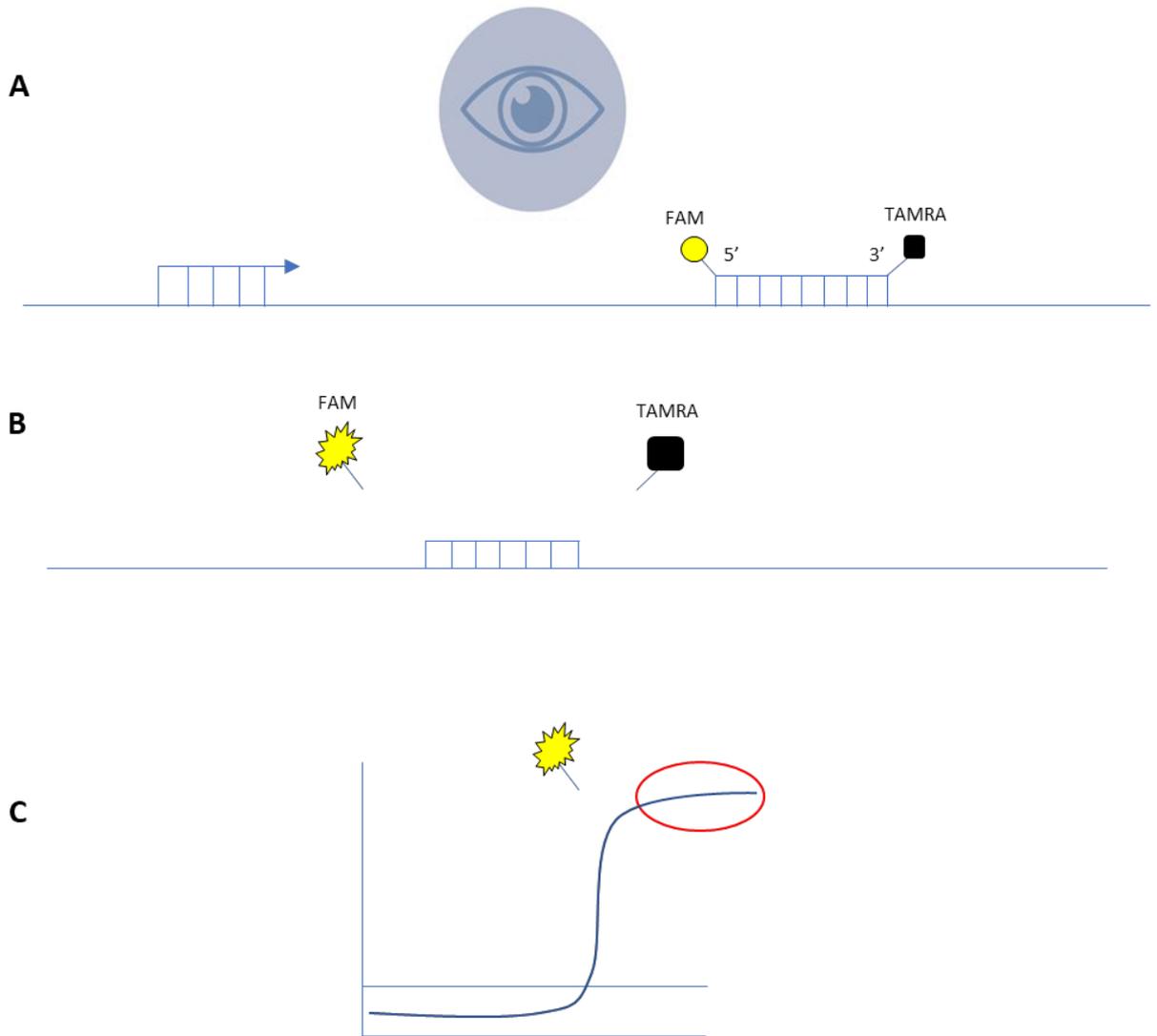


Figura 6- Esquema representativo do qPCR - interação entre FAM e TAMRA (Dubovi, 2011a): A - Sonda marcada na extremidade 5' com o fluorocromo FAM e na extremidade 3' com o TAMRA; B -Sonda emparelhada à sequência DNA amplificado, clivada pela enzima Taq polimerase, fluorocromo FAM e TAMRA separados; C - Fluorocromo FAM emite fluorescência, na ausência do inibidor TAMRA, esta é detetada no termociclador

1.6.2. Teste ELISA indireto

O teste ELISA é um método utilizado para detetar a presença de anticorpos ou de antígenos numa amostra. A designação de *enzyme linked* deve-se ao facto de usar um anticorpo ou um antígeno, ligado a um marcador enzimático que, na presença de um substrato cromogénico, causa um sinal que pode ser medido por espectrofotometria. O método ELISA indireto permite a deteção de anticorpos, utilizando vírus IBDV inativado como antígeno (Parthiban et al., 2008). A Figura 7 ilustra sucintamente o princípio do teste ELISA indireto para o IBDV. Para o revestimento das placas é utilizado o antígeno IBDV, posteriormente é adicionado o soro a testar, e segue-se um período de incubação. No caso de soros positivos os anticorpos ligam-se ao antígeno. Após um passo de lavagem é adicionado um soro anti-espécie (anti-imunoglobulinas de galinha) marcado com a enzima peroxidase (“conjugado”). Após um período de incubação e um passo de lavagem, o substrato cromogénico é adicionado. Na presença da peroxidase o substrato é oxidado, isto causa um sinal, a presença de cor. Pode dizer-se que o substrato cromogénico revela de forma indireta a ligação anticorpo-antígeno. A intensidade da cor, medida por espectrofotometria, está diretamente relacionada com a concentração de anticorpos presentes no soro em estudo.

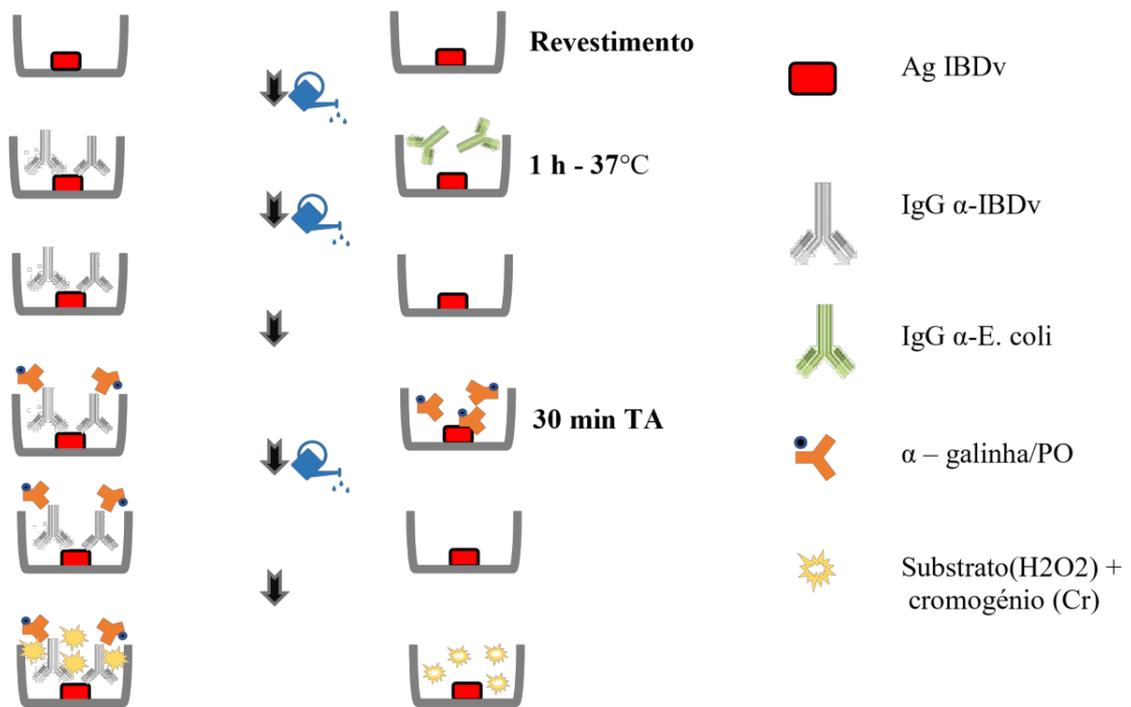


Figura 7- Esquema de funcionamento do teste ELISA indireto para IBDV

1.6.3. Proteínas recombinantes

As proteínas são produzidas de acordo com as necessidades funcionais da célula. É no DNA que se encontra a informação genética, esta é decodificada por processos transcripcionais para que seja produzido o mRNA. Esta informação codificada pelo mRNA é depois traduzida numa proteína. Na transcrição ocorre a transferência de informação genética do DNA para o mRNA, na tradução ocorre a síntese de proteínas baseada numa sequência indicada pelo mRNA, como mostra a figura 8.

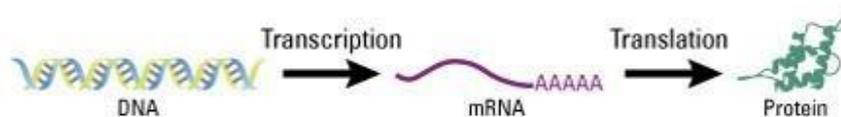


Figura 8- Diagrama ilustrativo da transcrição e tradução

Nos eucariotas, a transcrição e a tradução ocorrem em locais diferentes da célula, a transcrição tem início no núcleo, e a tradução ou produção da proteína, ocorre no citoplasma. O mesmo não acontece com os procariotas, onde o processo de transcrição e tradução ocorre simultaneamente.

Uma vez que as proteínas são bastante complexas e de tamanho considerável, a sua síntese química não é possível. Assim utilizam-se células vivas, recorrendo à sua maquinaria celular, com o objetivo de produzir proteínas baseadas em genes conhecidos. O DNA, ao contrário das proteínas, é fácil de construir. Esta construção pode ser feita sinteticamente ou *in vitro* utilizando técnicas de recombinação genética. As proteínas recombinantes são produtos da tradução de DNA exógeno incorporado em células vivas (Mikami et al., 2006; Mikami et al., 2006; Kobayashi et al., 2007; Mikami et al., 2008).

Atualmente, a produção de proteínas recombinantes é uma técnica muito usada em investigação. Estas proteínas apresentam uma vasta variedade de aplicações: na medicina, em investigação e em biotecnologia. Elas podem ser utilizadas em vacinas, no diagnóstico de doenças, e na elucidação do funcionamento de um organismo (CUSABIO, 2017). A produção de proteínas recombinantes engloba dois passos principais: a clonagem e a



expressão proteica. Por clonagem de um gene, ou de um qualquer fragmento de DNA entende-se: ligação de um gene (ou fragmento de DNA) a um vetor, formando uma molécula de DNA recombinante. Esta molécula é depois introduzida numa célula hospedeira, num processo denominado transformação, onde permanece não integrada no genoma do hospedeiro. A transformação é o processo através do qual uma bactéria, absorve DNA exógeno purificado da sua periferia, integrando-o de forma funcional no seu material genético (Videira, 2001). O vetor tem a capacidade de se replicar autonomamente. À medida que a célula hospedeira se vai dividindo, o vetor recombinante também se divide, formando assim um clone de células filha com o referido vetor. Como consequência o gene é amplificado muitas vezes podendo depois ser isolado e caracterizado. Com a cultura dessas mesmas células ocorre a transcrição e tradução da proteína desejada.

As células transformadas são depois submetidas a um processo de lise, de modo a extrair a proteína que foi expressa para posterior purificação. Podem ser utilizados sistemas de expressão proteica procarióticos ou eucarióticos. Podem ser utilizadas células de inseto, células de mamíferos, bactérias e leveduras. A expressão em bactérias é o sistema mais utilizado (Rosano & Ceccarelli, 2014).

A bactéria melhor conhecida e investigada quer a nível bioquímico quer a nível genético é a *Escherichia coli*. Este microrganismo possui características desejáveis, como o facto de não ser patogénico para muitos outros organismos e ser facilmente cultivável em laboratório, explicando a sua ampla utilização na clonagem. A grande desvantagem na utilização deste sistema é a tendência para a formação de corpos de inclusão, tornando as proteínas insolúveis. Quando um gene exógeno é introduzido em *E. coli*, o controlo espaço-temporal da sua expressão é perdido, assim o polipéptido recém sintetizado é expressado num microambiente, relativamente à *E. coli*, diferente do original em termos de pH, osmolaridade e potencial redox. Isto leva a instabilidade e agregação das proteínas expressadas, conhecidos por corpos de inclusão (Rosano & Ceccarelli, 2014).

Como muitas proteínas se tornam insolúveis devido à formação de corpos de inclusão, torna-se necessário recorrer a métodos de solubilização, que utilizam tampões fortemente desnaturantes. A cromatografia de afinidade (*immobilized metal affinity chromatography* - IMAC), é um método utilizado para a purificação de proteínas recombinantes, que

envolve a ligação covalente de um reagente denominado ligante de afinidade, a um suporte sólido (Pang et al., 2015). Baseia-se na afinidade da proteína recombinante para o níquel. Esta proteína apresenta caudas de histidina, estas por sua vez apresentam afinidade para o níquel, permitindo que o processo decorra. Este método compreende duas fases: i) estacionária; ii) móvel. A fase estacionária é constituída por um sólido, como a agarose ou microesferas de vidro, no qual é imobilizado o ligante de afinidade. O ligante pode ser de várias naturezas desde anticorpos, antigénios, enzimas, substratos, proteínas (Chang et al., 2017). No trabalho que apresentamos o ligante produzido foi a proteína recombinante (VP2) do IBDV. A fase móvel vai desempenhar dois papéis distintos, permitir uma forte ligação das moléculas do analito ao ligante, remover as proteínas indesejáveis e, permitir a eluição do analito. A eluição pode ser feita com mudança no pH ou da força iónica. Isto vai permitir alterar as condições da eluição durante as duas fases do processo. Este tipo de cromatografia tem como vantagem ser bastante seletiva (Chang et al., 2017).

A proteína recombinante do IBDV pode ser utilizada para fins profiláticos, na imunização das aves, através da vacinação, em que a proteína purificada constitui o antigénio vacinal, sendo, portanto, uma vacina de subunidade. As proteínas recombinantes podem, ainda, ser utilizadas no diagnóstico da doença como antigénios em testes ELISA indiretos, ou como controlo positivo nos métodos de *Immunoblot*. A produção da proteína recombinante apresenta as vantagens de poder ser produzida de forma relativamente rápida, e possuir a dualidade de utilização, fins profiláticos e diagnóstico (Arnold et al., 2012; Taghavian et al., 2013; Pang et al., 2015).

A confirmação da expressão da proteína recombinante é habitualmente realizada por dodecil sulfato de sódio eletroforese em gel de poliacrilamida (*Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis - SDS-PAGE*) e *Immunoblot*.

O SDS-PAGE é um método consiste na separação de proteínas de acordo com a sua massa molecular e cargas elétricas. Estas características vão determinar a velocidade de migração das mesmas através de um gel (Fig.9). O método envolve um primeiro passo de desnaturação de proteínas recorrendo a um detergente, o dodecil sulfato de sódio (*Sodium dodecyl sulfate - SDS*), calor e um agente redutor (beta-mercaptoetanol) e num segundo passo a separação das proteínas num gel de acrilamida, num processo denominado de

eletroforese em gel de poliacrilamida (*Polyacrylamide gel eletrophoresis - PAGE*) (Altubuly, 1996).

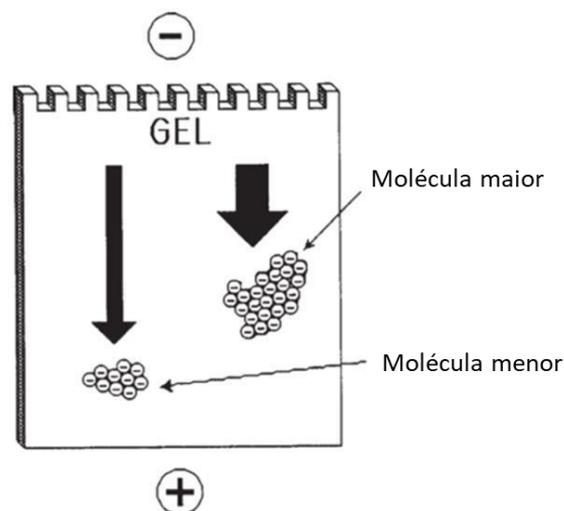


Figura 9- Esquema representativo da migração de proteínas de diferentes tamanhos no gel de poliacrilamida (Al-Tubuly, 1996)

O *Western Blot*, também designado por *Immunoblot*, é um método muito utilizado para separar e identificar proteínas. Nesta técnica as proteínas são inicialmente separadas num gel de poliacrilamida por SDS-PAGE. Estas proteínas são depois transferidas para uma membrana, produzindo uma banda para cada proteína. Esta membrana é depois incubada com anticorpos específicos para a proteína de interesse. Segue-se a lavagem da membrana e, apenas os anticorpos específicos permanecem ligados à proteína de interesse. Estes são depois detetados através da revelação da membrana. Uma vez que os anticorpos apenas se ligam à proteína de interesse, apenas se deveria observar uma banda, o que muitas vezes não acontece por inespecificidade dos soros utilizados ou porque a purificação não foi 100% eficaz. A espessura da banda observada corresponde à quantidade de proteína presente, (Healthcare, 2011; Mahmood & Yang, 2012).

2. Objetivos

Este trabalho, realizado no Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV, I.P.), em Oeiras, entre setembro de 2017 e março de 2018, teve como objetivo geral a familiarização com as metodologias de isolamento, multiplicação e identificação de birnavírus das aves. O plano de trabalho foi o que se segue: i) colheita e preparação de amostras para exame virológico: escolha das amostras a utilizar para isolamento de vírus; preparação de inóculos (homogeneização, centrifugação, filtração, antibióticos); ii) isolamento e multiplicação de vírus em ovos embrionados de galinha e cultura de células: condições para a multiplicação, manutenção e conservação de linhas celulares; isolamento e propagação de vírus em culturas celulares; observação do efeito citopático; iii) identificação do agente viral: métodos moleculares para deteção e identificação de IBDV; deteção de anticorpos IBDV pelo método ELISA; iv) expressão e purificação da proteína viral VP2 em *E.coli*.

Ao longo do estágio foram realizadas várias metodologias de diagnóstico de doença de Gumboro, tais como: isolamento e multiplicação de IBDV em ovos embrionados e em cultura de células FEPI; teste ELISA indireto; extração de RNA total a partir de macerados de órgãos e de células inoculadas para deteção do IBDV por RT-PCR e RTqPCR.

No período em que decorreu o estágio foram utilizadas duas amostras de órgão de aves enviadas ao laboratório com a suspeita de infeção por IBDV. Numa primeira abordagem, recorreu-se ao diagnóstico molecular por RT-qPCR. Esta metodologia permite a deteção de RNA viral em menos de 24h. Contudo, e apesar de ser um método moroso (2 a 10 dias), a inoculação de ovos e/ou de cultura de células, para isolamento do agente viral continuam, ainda hoje, a ser o método utilizado no diagnóstico laboratorial do IBDV, uma vez que aumentam a sensibilidade dos testes moleculares, pois quando estes métodos são aplicados em amostras diretamente das aves afetadas, os resultados são pouco fidedignos devido a ligações inespecíficas dos primers. Por este motivo as amostras em estudo foram também inoculadas em ovos e culturas primárias de fígado de embrião de pinto (FEPI).

Com o objetivo de desenvolver um ELISA para deteção de anticorpos IBDV em aves, recorreremos à multiplicação do IBDV em culturas de células FEPI, concentração do vírus



por ultracentrifugação e purificação em gradiente de sacrose. Antes da sua utilização nos ensaios, o vírus purificado foi inativado pelo formol a 0,1%, durante 24h.

Para cumprimento do quarto objetivo do plano de trabalho e, com vista ao desenvolvimento de um ELISA de “segunda geração” e, de uma eventual vacina de subunidade, procedeu-se à tentativa de clonagem e expressão em *E. coli* da VP2 do isolado IBDV (39990-2017). As dificuldades em expressar esta proteína, obrigou-nos a optar pela expressão da VP2 truncada. Para o efeito amplificou-se por RT-PCR apenas a região do gene que codifica o epitopo responsável pela indução de anticorpos neutralizantes. Para o efeito foram utilizadas várias técnicas, nomeadamente RT-PCR convencional, purificação do fragmento amplificado em gel de agarose, clonagem e subclonagem em vetores apropriados, expressão, concentração e purificação da proteína por IMAC. Por último, o grau de pureza da proteína recombinante obtida foi avaliado por SDS-PAGE.

3. Metodologias de diagnóstico de birnavírus nas aves

3.1. Materiais e métodos

3.1.1. Isolamento, multiplicação e identificação de vírus em cultura de células e em ovos embrionados

3.1.1.1. Isolamento e multiplicação de birnavírus

Os vírus são parasitas intracelulares obrigatórios, como tal para o seu isolamento é necessário recorrer à utilização de ovos embrionados ou culturas de células. O ovo constitui um bom meio para o crescimento e multiplicação de vírus, uma vez que tem grande variedade de tecidos e fluidos cavitários que suportam a replicação e concentração viral, (Dubovi, 2011a; Hematian et al., 2016).

Neste trabalho procedeu-se à inoculação de ovos embrionados e à cultura de células primárias de fígado de embrião de pinto para o isolamento e multiplicação de birnavírus. Os inóculos foram provenientes de amostras recebidas no laboratório com suspeita de infeção por IBDV, às quais se atribuiu os números de identificação 39990-2017 e 10422010. Ambas as amostras eram constituídas por órgãos como bolsa de Fabricius e fígado. Para a preparação das mesmas foi feito um macerado com tampão fosfato salino (*Phosphate-Buffered Saline* – PBS) estéril, conservou-se o sobrenadante resultante.

3.1.1.2. Inoculação de ovos embrionados de galinha

Os ovos com 6 dias de incubação foram observados recorrendo ao uso do ovoscópio para avaliar a presença de vasos sanguíneos ingurgitados e movimentos do embrião. A câmara de ar foi identificada e marcou-se o local de inoculação (saco vitelino). O local de inoculação foi desinfetado, de seguida, procedeu-se à inoculação dos ovos com 0,2 ml de uma suspensão de macerado de órgãos em PBS (10% p/v) correspondente às amostras em cima referidas (Fig.10). Os ovos foram depois incubados a 37°C numa atmosfera com 62% de humidade (aprox.), durante cinco dias. Durante este período os ovos foram observados diariamente ao ovoscópio para avaliar a vitalidade dos embriões e contabilizar a mortalidade dos mesmos. No final do período de incubação, procedeu-se à abertura dos ovos inoculados.

Os embriões foram retirados e avaliou-se a presença de lesões, como hemorragias e congestão ao nível dos músculos e mucosas. Acedeu-se à cavidade abdominal do embrião para colheita do fígado. Depois um processo físico de maceração, recorrendo a um almofariz, juntou-se PBS estéril. A suspensão foi transferida para um tubo estéril e clarificada por centrifugação durante 10 minutos a $450 \times g$. O sobrenadante (5 ml) resultante foi colhido e conservado a -20°C num tubo estéril até à sua utilização.



A)



B)

Figura 10- Ovos embrionados de galinha com 6 dias de incubação preparados para a inoculação das amostras 39990-2017 e 1042-2010: A) Depois de desinfetados com uma solução de álcool e iodopovidona (Betadine) e com auxílio de uma punção abriram-se dois orifícios, um na câmara de ar e outro no lado oposto ao do embrião; B) Para a inoculação introduziu-se a agulha neste

último orifício até atingir o saco vitelino. Após a inoculação os orifícios foram tapados com parafina.

3.1.1.3. Multiplicação do IBDV em cultura de células FEPI

Por cultura celular entende-se crescimento de células *in vitro*. Neste trabalho foram usadas células primárias de fígado de embrião de pinto - FEPI.

As culturas de células de linha apresentam vantagens comparativamente ao uso de animais ou de ovos embrionados, uma vez que, para além das questões éticas, são mais fáceis de manipular e menos dispendiosas, constituem uma população homogénea, livre de influências imunológicas e hormonais que poderiam interferir com a multiplicação viral, para além disto têm a vantagem de poderem ser conservadas em azoto líquido, podendo ser usadas a qualquer momento. No entanto isto não acontece com as células primárias, cujo tempo de vida é muito mais curto (Hematian et al., 2016). Contudo, as culturas primárias são muito úteis no isolamento de vírus difíceis de adaptar às linhas celulares contínuas como é o caso de algumas estirpes do IBDV.

O substrato adequado para a cultura de células é aquele que mais se assemelha às condições *in vivo*. O meio de cultura tem como finalidade assegurar os nutrientes necessários às células e ainda diluir os metabolitos resultantes do metabolismo celular. O meio de cultura deve fornecer sais inorgânicos, água, aminoácidos, proteínas, hidratos de carbono e vitaminas, de forma a suprir as necessidades celulares (Tab.3):

Tabela 3 - Constituição dos meios de cultura e as suas funções (Zavattieri, 2003).

	Função	
Sais Minerais	Manutenção da tonicidade; Tamponamento do meio de cultura; Equilíbrio das membranas celulares; Fornecimento de oligoelementos	Na ⁺ ; K ⁺ ; Ca ²⁺ ; Mg ²⁺ ; Fe ²⁺ ; CO ₃ ²⁻ ; PO ₄ ³⁻ ; SO ₄ ²⁻
Aminoácidos	Síntese de proteínas e ácidos nucleicos.	Arg; Cys; His; Ile; Leu; Met; Phe; Thr; Trp; Tyr; Val
Proteínas	Fonte energética	
Hidratos de carbono	Fonte energética	glucose
Vitaminas	Coenzimas no metabolismo	
Soro sanguíneo	Fator de crescimento; Destoxicante; Fonte energética; Tamponamento.	
Antibióticos	Proteção contra contaminação bacteriana	Gentamicina ou outros

A temperatura ótima de crescimento situa-se entre 36 e 38,5°C. O pH entre 6,8 e 7,6. O nível de CO₂ tem também um papel fundamental no crescimento celular, sendo adequada uma atmosfera com 5%. O CO₂ é importante para prevenir a perda de CO₂ e de bicarbonato dissolvidos no meio, contudo, em excesso, provoca a morte das células. Foram utilizados ovos livres de agentes patogénicos específicos (*Specific Pathogen Free* - SPF) com 15 a 18 dias de incubação. A vitalidade dos embriões foi avaliada recorrendo ao ovoscópio, como descrito anteriormente. Os ovos foram abertos de modo a aceder ao embrião. Seguiu-se a colheita do fígado, como descrito anteriormente. Os fígados foram colocados numa placa de Petri estéril com PBS para retirar os tecidos adventícios e o excesso de sangue e depois transferidos para um tubo estéril de 15 ml (Fig.11). Adicionou-se PBS e agitou-se o tubo manualmente de modo a fragmentar o tecido hepático. Depois de sedimentados os fragmentos de fígado, o sobrenadante foi descartado. Adicionou-se 6 ml de tripsina (0,25%) a 30 °C, agitou-se durante três minutos de modo a facilitar a sua atuação. Descartou-se o sobrenadante da primeira lavagem com tripsina. Repetiu-se o processo quatro a cinco vezes, preservando o sobrenadante, ao qual se adicionou soro fetal bovino até perfazer a concentração final de 2%. Prosseguiu-se com a filtração, recorrendo a uma gaze e funil esterilizados (Fig.12) e, sedimentação dos hepatócitos por centrifugação a 200 ×g durante 10 minutos. Descartou-se o sobrenadante, o *pellet* de células foi ressuscitado na proporção de 1:150 em meio de cultura HepatoZYME-SFM (ThermoFisher, Massachusetts, USA) com 10% de soro fetal bovino. A suspensão de células foi distribuída em garrafas de cultura de células de 25 cm² (T25) e incubadas a 37 °C, em atmosfera com 5% de CO₂ até formação completa do tapete celular (24h a 48h). Após o que se procedeu à sua inoculação com as amostras anteriormente preparadas (0,5ml/frasco). As culturas de células foram mantidas durante 5 a 7 dias para observação do efeito citopático (EC).

Todos os procedimentos foram efetuados na câmara de fluxo laminar vertical. Os materiais utilizados foram previamente esterilizados, de modo a evitar a contaminação da cultura de células.



Figura 11 - Colheita de órgãos, fígado, de embrião de pinto na câmara de fluxo laminar



Figura 12 – Filtração da suspensão de células com funil e gaze esterilizados, na câmara de fluxo laminar

3.1.1.4. Inoculação de células FEPI com IBDV

O efeito citopático (EC) manifesta-se, geralmente, pela morte das células em cultura depois de inoculadas ou por uma alteração muito significativa na sua morfologia observada através do exame microscópico da cultura de células (Dubovi, 2011a).

As alterações mais frequentes provocadas pelo IBDV são o destacamento e arredondamento das células, sendo isto indicativo de infeção das mesmas (Dubovi, 2011a).

Procedeu-se à inoculação da cultura de células FEPI com as amostras 39990-2017 e 10422010, as mesmas utilizadas na inoculação dos ovos embrionados.

Frascos de 25 cm² com culturas de células FEPI, preparadas conforme descrito anteriormente e com o tapete de células semi-confluente, foram inoculados com 0,5 ml do sobrenadante do macerado das amostras, 39990-2017 e 1042-2010. As culturas foram mantidas durante 4 a 5 dias, nas condições descritas para preparação das células FEPI e observadas diariamente com auxílio de um microscópio invertido, para registo da evolução do EC. As culturas com EC evidente foram posteriormente submetidas a três ciclos de congelação e descongelação de forma a provocar lise das células e facilitar a libertação das partículas virais.

Foram também usadas outras culturas celulares, nomeadamente células de linha provenientes de carcinoma hepatocelular de galinha (*Gallus gallus*) (*Chicken Liver Hepatocellular carcinoma* - LMH) e provenientes de rim de macaco (*African green monkey kidney* - VERO)

3.1.1.5. RT-PCR e RT-qPCR para deteção de e birnavírus

Neste trabalho foram realizados três ensaios distintos de amplificação parcial do gene que codifica a proteína de interesse, a VP2. Foram eles a amplificação por RT-PCR convencional com as reações de transcrição reversa e PCR realizadas separadamente ou em conjunto num mesmo tubo e, por fim, a amplificação quantitativa por RT-qPCR.

Foram utilizados diferentes kits comerciais e condições de reação também diferentes.

As amostras testadas foram: cultura de células FEPI inoculadas com os isolados 10422010 e 39990-2017; macerado de órgãos como o fígado e bolsa de Fabricius (BF) de embriões inoculados com os isolados 1042-2010 e 39990-2017.

Como controlo positivo foi utilizado o RNA de uma estirpe vacinal IBDV (BVR706).

Como controlo negativo foi utilizada água *RNAse free*.

O RNA foi extraído a partir das amostras, nomeadamente, cultura de células FEPI inoculadas e macerado de órgãos (fígado e bolsa de Fabricius), usando o kit comercial QIAamp Viral RNA MiniKit (Quiagen, Germany), de acordo com as indicações do fabricante.

Tabela 4 - Amostras utilizadas em cada método de amplificação

Método de amplificação	Amostras utilizadas
RT-PCR	Macerado de BF e fígado de embriões inoculados com o isolado 1042-2010; Cultura de células FEPI inoculada com o isolado 1042-2010.
RT-PCR com RT separadamente	Cultura de células FEPI inoculada com o isolado 1042-2010; Cultura de células FEPI com o isolado 39990-2017.
RT-qPCR	Três culturas de células FEPI distintas inoculadas com o isolado 1042-2010; Macerado de BF e fígado de embriões inoculados com o isolado 39990-2017.

3.1.1.5.1. Amplificação por RT-PCR

Procedeu-se à amplificação de um fragmento do gene que transcreve a proteína viral VP2 com 491 bp recorrendo aos *primers* P3 direto 5' - GCC CAG AGT CTA CAC CAT AAC TGC – 3' e P4 reverso 5' - GCG ACC GTA ACG ACA GAT CC – 3'.

A reação de amplificação constitui num passo inicial de desnaturação a 98°C da mistura de primers e RNA viral seguido de um arrefecimento rápido num banho de gelo fundente. A esta mistura juntaram-se os reagentes necessários para a reação RT-PCR, utilizando o kit comercial AgPath, One-Step RT-PCR (ThermoFisher, Massachusetts, EUA). As condições de amplificação constituíram num passo a 45°C durante 15 min, necessário para a atividade

da transcriptase reversa, ao que se seguiram um passo a 95°C para ativação da Taq polimerase durante 2 min e depois 50 ciclos de amplificação (95 °C – 30 s; 55°C – 30 s; 70°C – 45 s), por fim seguiu-se uma extensão final a 70 °C 5 min. Para a amplificação foi usado um termociclador de tampa aquecida *UNO II Thermal Cycler (Biometra)* como mostra a Figura 13.



Figura 13 - Termociclador de tampa aquecida UNO II (Biometra) utilizado no RT-PCR

3.1.1.5.2. Amplificação por RT-PCR com reação RT realizada separadamente

Para uma produção de cDNA mais eficiente recorreu-se ao kit comercial Expand Reverse Transcriptase (Sigma-Aldrich, Germany), de acordo com as indicações do fabricante (Tab.5).

Tabela 5 - Reagentes utilizados na reação de transcrição reversa

<i>Reagentes</i>	<i>Volume</i>
<i>Buffer</i>	4 μL
<i>DTT 100mM</i>	2 μL
<i>dNTPs</i>	2 μL (10 mM)
<i>primers hexâmeros</i>	1 μl (50 μM)
<i>RT</i>	1 μL

Procedeu-se à amplificação do mesmo fragmento do gene recorrendo aos mesmos primers, P3 e P4. Para a amplificação do cDNA obtido foi utilizado o kit comercial Expand High Fidelity PCR System (Roche Applied Science, Mannheim, Germany). Após a ativação da Taq polimerase a 95 °C durante 2 min, a amplificação decorreu em 50 ciclos (95°C 30 s; 52°C 30 s; 72°C 30 s), seguiu-se a extensão final a 72°C durante 5 min.

3.1.1.5.3. Amplificação por RT-qPCR

O RT-qPCR foi realizado num termociclador *CFX96 Real-Time Detection System* (BioRad).

A amplificação do fragmento do gene foi realizada recorrendo aos *primers* P3 e P4 de sequência mencionada anteriormente, e a uma sonda com a sequência 5' – TGA TGC CAA CAA CCG GAC CGG CG – 3'.

Para a reação recorreu-se ao kit comercial One Step RT-PCR (Quiagen, Germany), de acordo com as instruções do fabricante. Os reagentes utilizados foram os indicados na Tabela 6:

Tabela 6 - Reagentes utilizados no RT-qPCR

Reagentes	Volume (μL)
<i>Primer forward</i>	0,5 (25 μmol)
<i>Primer reverse</i>	0,5 (25 μmol)
RNA	5
Sonda FAM	0,5 (5 μmol)
Enzima	1
dNTPs	1 (10 mM)
Tampão	5
Água	11,5
	25

A prévia desnaturação do dsRNA não foi efetuada e, após a ativação da enzima Taq polimerase a 95°C durante 5 min, a amplificação decorreu em 44 ciclos (45°C 15 min; 95°C 10 min; 95°C 15 min; 60°C 30 min). A temperatura de 95°C permite a ativação da enzima da Taq e a simultânea inativação da RT. Seguiu-se a extensão final a 72°C durante 5 min. O produto da reação foi mantido a 20°C até leitura dos resultados.

3.1.2. Detecção de anticorpos anti-IBDV pelo método ELISA indireto

Com a finalidade de avaliar a presença de anticorpos anti-IBVD em soros de galinha, foi realizado o teste ELISA indireto utilizando como antígeno uma preparação purificada de IBDV inativado.

Neste trabalho foram testados 310 soros de aves adultas, 100 (32%) provenientes de galinhas poedeiras, 70 (23%) provenientes de frangos do campo, 60 (19%) de galinhas reprodutoras, 40 (13%) de patos de engorda, e por fim 40 (13%) de perus (Fig.14).

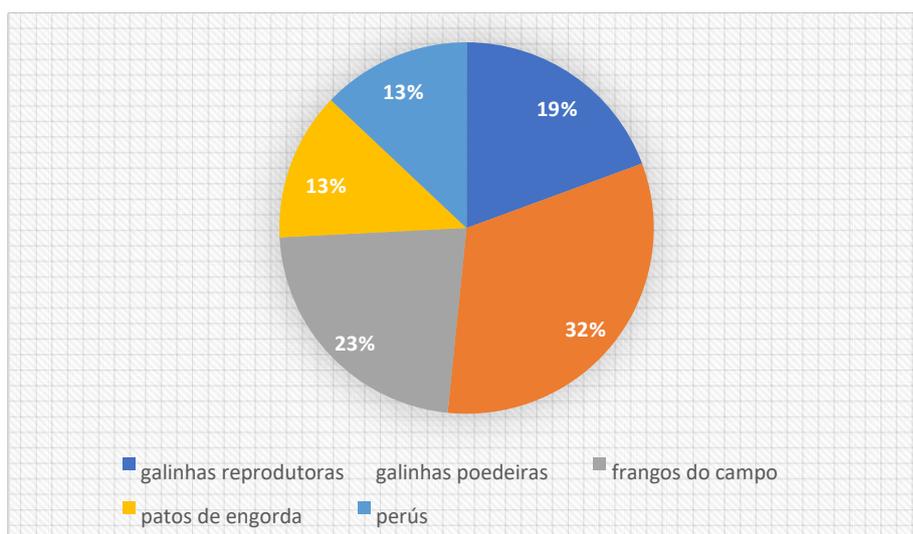


Figura 14 –Amostra de animais testados

Para a pesquisa de anticorpos anti-IBDV nos soros, foi usado o teste ELISA – IBDV *in house*, utilizando antígeno produzido no laboratório. As placas foram revestidas com o antígeno (IBDV) diluído a 1:1000 com tampão carbonato-bicarbonato. Um volume de 100 μ L foi distribuído por todos os poços e a placa foi incubada a 4 °C *overnight*. Seguiu-se a lavagem (450 μ l / poço) com tampão PBS-Tween (0,05%) de todos os poços. Para bloquear os espaços sem antígeno (IBDV) ligado, foi utilizada albumina bovina a 0,5% (PENTEX, *bovine albumin fraction V*), esta foi distribuída por todos os poços (100 μ L). A placa foi novamente incubada a 4 °C *overnight*. Seguiu-se uma nova lavagem com tampão PBS-Tween. Os soros a testar foram diluídos a 1:500 com tampão de diluição de soros e uma quantidade de 100 μ L foi dispensada em cada poço. Após um período de incubação de 1

hora a 37 °C, realizou-se a lavagem de todos os poços com tampão PBSTween e a distribuição de 100 µL de conjugado (soro anti-galinha marcado com peroxidase) diluído a 1:40000 com tampão de diluição de soros. Seguiu-se um período de incubação de 30 minutos à temperatura ambiente. Após uma lavagem com tampão PBSTween para remoção do conjugado. Para revelar a reação, procedeu-se à distribuição de 100 µL do substrato-cromogénio tetramethylbenzidina (TMB) por todos os poços. A placa foi incubada 20 minutos à temperatura ambiente. Distribuiu-se a solução STOP (ácido sulfúrico 2N) e efetuou-se a leitura da intensidade da cor em unidades de absorbância por espectrofotometria a um comprimento de onda de 450 nm.

O resultado é lido de acordo com a densidade ótica (DO) da reação. Para categorizar os resultados numéricos das DO em positivos, negativos ou duvidosos, são utilizados os valores médios da DO (dois poços) dos controlos positivos e negativos por placa. Para tal efetua-se a determinação dos valores de *cut off* que correspondem a valores estimados e calculados de acordo com as fórmulas indicadas, permitindo determinar se as amostras são positivas ou negativas.

Positivo: \bar{x} das DO de soros negativos + 3xdesvio padrão das \bar{x} DO soros neg
Negativo: média das \bar{x} DO de soros negativos

Os resultados que se posicionem acima do valor de *cut off* positivo são considerados positivos, os que se posicionem iguais ou abaixo do *cut off* negativo são considerados negativos. Os que se posicionem entre os valores de *cut off* (positivo e negativo) são considerados duvidosos e, neste caso, as amostras devem ser testadas de novo. Se o resultado se mantiver inconclusivo dever-se-á recorrer a outro método ou a nova colheita da amostra. (Lardeux et al., 2016)

Neste trabalho, os valores de *cut off* foram calculados de acordo com as fórmulas indicadas e foi utilizada uma folha Excel, previamente criada, que nos dá os resultados como positivo, negativo e duvidoso automaticamente quando são introduzidos os valores das DO, obtidas no espectrofotómetro.

3.2. Resultados

3.2.1. Isolamento, multiplicação e identificação de vírus em cultura de células e em ovos embrionados

3.2.1.1. Isolamento de birnavírus

Verificou-se uma mortalidade de 100% dos embriões, cinco dias após a inoculação, sendo que a mortalidade nos primeiros se verificou 24 horas após a inoculação.

Os embriões mortos apresentavam lesões típicas provocadas por birnavírus, designadamente hemorragias generalizadas e congestionamento das mucosas, como mostra a Figura 15. O fígado foi o órgão mais afetado, apresentou-se com petéquias difusas. A Figura 16 mostra a colheita dos fígados com alterações para posterior análise molecular.



Figura 15 - Embrião morto após inoculação com birnavírus, com lesões típicas



Figura 16 - Fígados de embriões afetados, com lesões de birnavírus

3.2.1.2. Inoculação de células FEPI com IBDV

Na Figura 17, que corresponde a uma cultura de células FEPI não inoculada, é possível observar o tapete celular completamente formado, este é constituído por hepatócitos. Os vacúolos e vesículas no citoplasma das células, (setas azuis), correspondem a uma alteração fisiológica, uma vez que as células estão a metabolizar a glucose e nutrientes do meio de cultura.

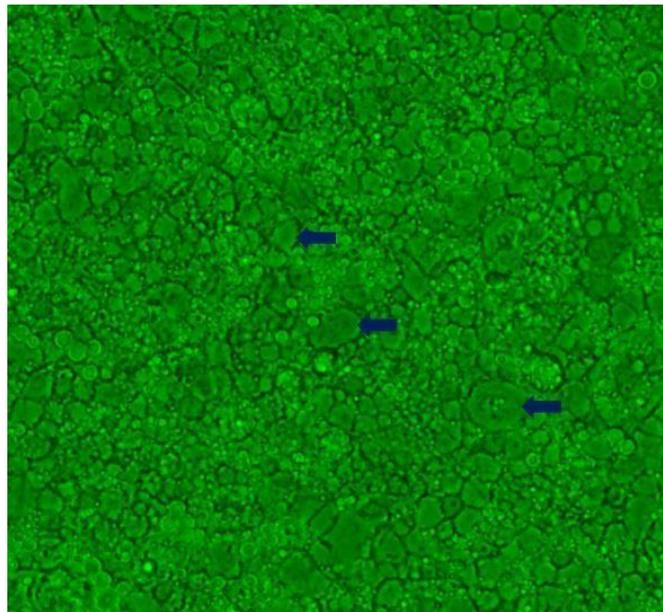
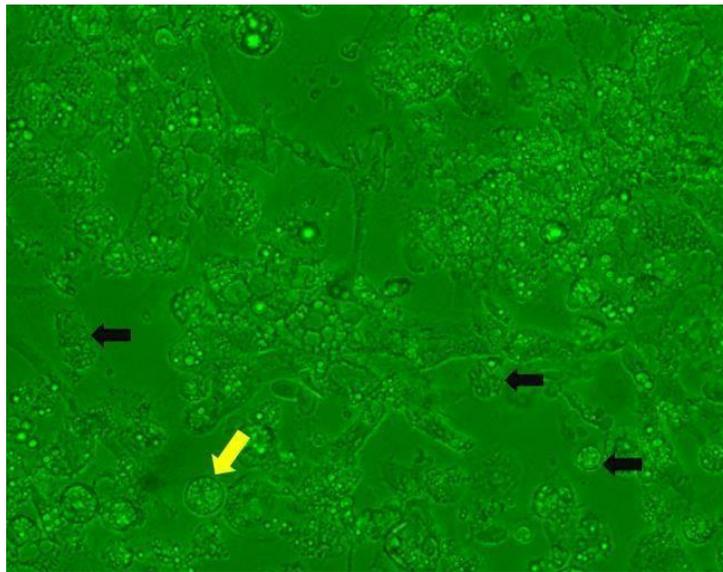


Figura 17 - Imagem microscópica obtida por contraste de fase do tapete celular completo de células FEPI normais, algumas com vacúolos e vesículas no citoplasma (setas azuis), com uma ampliação 200x

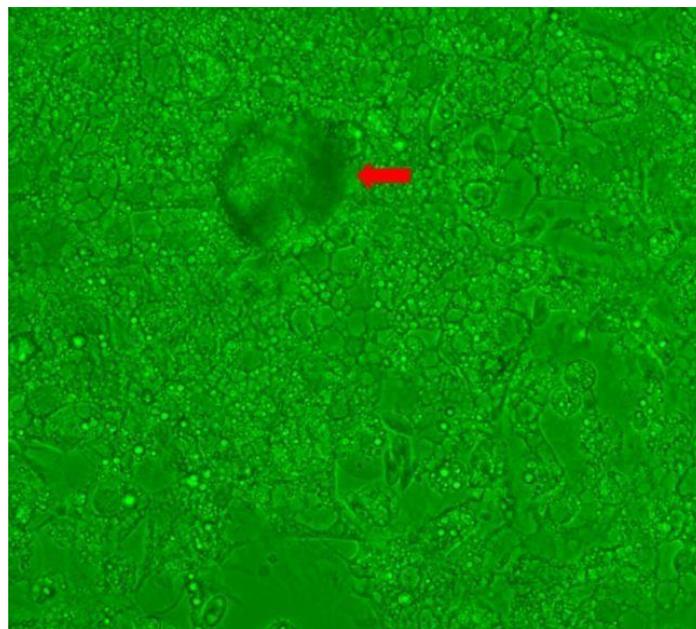
A multiplicação dos isolados 39990-2017 e 1042-2010 em células foi confirmada pela observação do efeito citopático, consistindo no arredondamento e destacamento das células infetadas, como mostra a Figura 18 – A (seta amarela), e por fim morte celular, como se pode ver na Figura 18 – A (setas pretas). O efeito citopático evoluiu ao longo do tempo como se pode verificar nas Figuras 18, 19 e 20, que correspondem a imagens microscópicas das células 48h e 72h após a inoculação. Às 48h após inoculação verificouse uma alteração celular típica de reovírus, que consiste na formação de células multinucleadas ou sincícios que depois se destacam do tapete celular como mostra a Figura 18 - B (seta vermelha).

Na Figura 19 é possível observar fibroblastos (setas azuis), estes proliferam mais tardiamente em relação aos hepatócitos, e na figura predominam sobre os hepatócitos. É também possível observar a morte das células (setas pretas).

Na Figura 20 é possível observar arredondamento de células com destacamento (setas amarelas), esta corresponde à inoculação com o isolado 1042-2010. É também possível observar a proliferação de fibroblastos (setas azuis).



A.



B.

Figura 18 - Imagem microscópica do efeito citopático observado 48h após a inoculação com o isolado 39990-2017, com ampliação 200x: (A) efeito citopático de birnavírus (setas pretas e seta amarela); (B) Efeito citopático suspeito de reovírus (seta vermelha), após inoculação com a amostra 39990-2017. A observação de efeitos citopáticos diferentes nas culturas de células FEPI levantaram a suspeita da existência dos dois vírus já referidos na amostra em estudo.

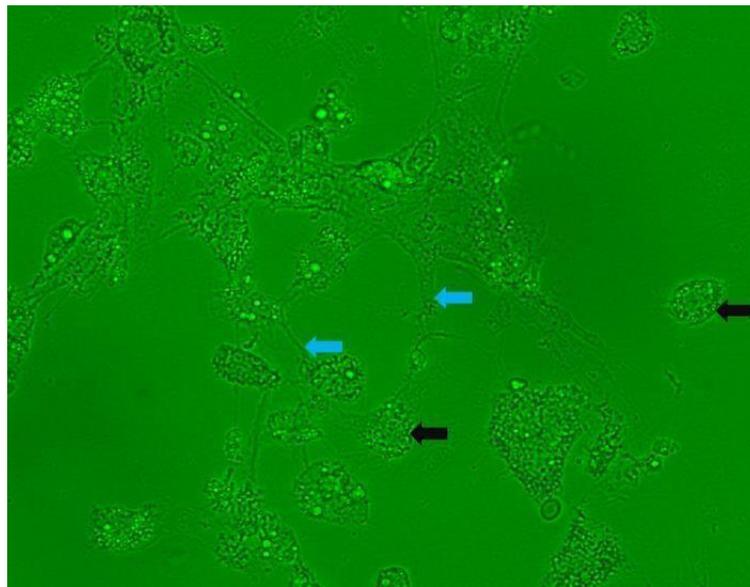


Figura 19- Imagem microscópica, obtida por contraste de fase, do efeito citopático de birnavírus (setas pretas) observado 72h após a inoculação com o isolado 39990-2017, com fibroblastos (setas azuis) com ampliação 200x

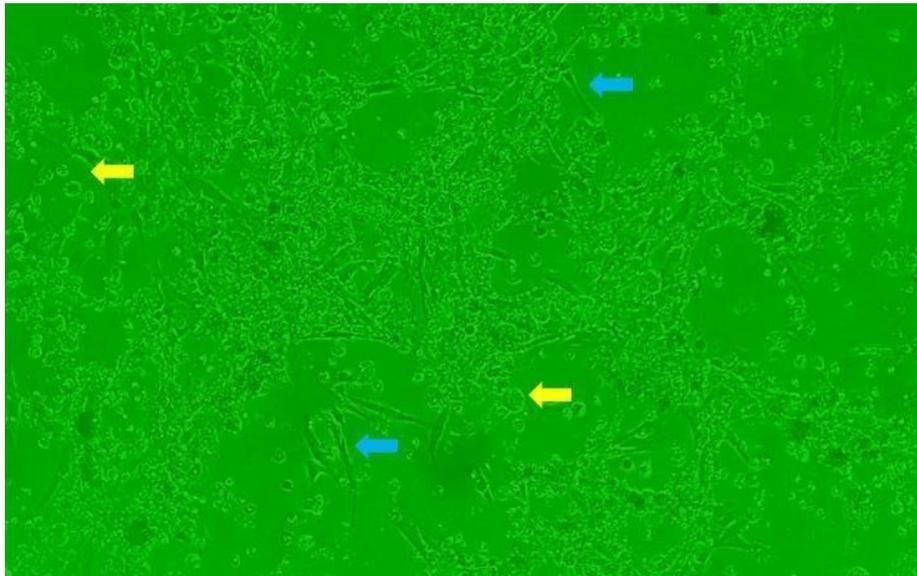


Figura 20 - Imagem microscópica, obtida por contraste de fase, de efeito citopático (setas amarelas) observado 48h após a inoculação com a amostra 1042-2010. A presença de fibroblastos (setas azuis) é já visível. Ampliação 100x.

Não foi observado efeito citopático nas culturas celulares LMH e VERO após inoculação com as duas amostras em estudo.

3.2.1.3.RT-PCR e RT-qPCR para detecção de birnavírus

3.2.1.3.1. Amplificação por RT-PCR

A Figura 21 apresenta o resultado do ensaio RT-PCR com RNA extraído de macerado de órgãos (fígado e BF) de embriões de pinto, e de uma cultura de células FEPI inoculadas com a amostra 1042-2010. Esta amostra foi negativa para IBDV, pelo que as lesões observadas nos embriões de pinto e o EC observado nas células de fígado se devem à presença de outro vírus na amostra, provavelmente um reovírus.

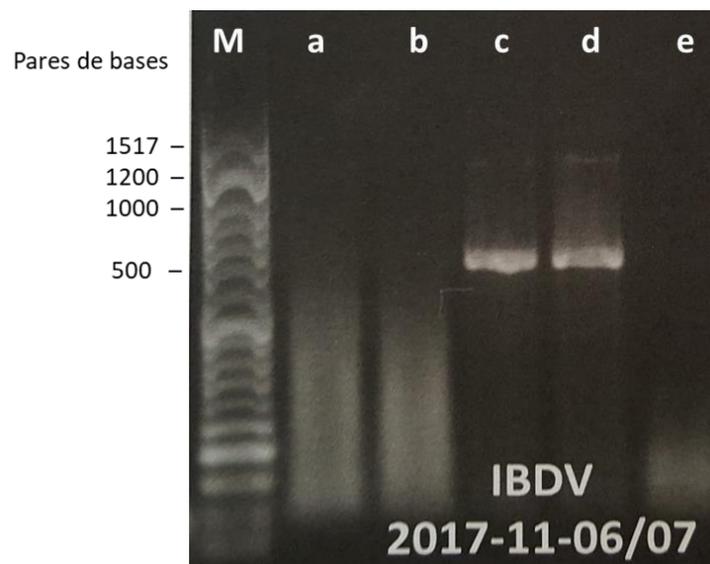


Figura 21 - Análise eletroforética de produtos amplificados por RT-PCR utilizando os primers P3 e P4 e RNA extraído de várias matrizes da amostra 1042-2010. O tamanho esperado do produto RT-PCR é de 491 pb): M- Marcador Quick Load 100bp DNA Ladder; a – 1042-2010, macerado da BF e fígado; b – 1042-2010, cultura de células FEPI, 5 dias pós-inoculação; c, d – Controlo positivo (vacina- BVR706); e – Controlo negativo (H2O).

3.2.1.3.2. Amplificação por RT-PCR com RT separadamente

Na tentativa de aumentar a sensibilidade de deteção para o IBDV, optámos por realizar a reação RT-PCR em dois passos. Num primeiro passo fez-se a reação RT para obtenção do cDNA. Para o passo seguinte, transferiu-se o cDNA (5µl) para um novo tubo onde se realizou a reação de amplificação por PCR. Na Figura 22 é possível observar o resultado da análise de duas culturas de células inoculadas com duas amostras diferentes, 10422010 e 39990-2017, respetivamente. O que se verifica é que apenas a amostra 399902017 resultou positiva a IBDV.

Pares de bases

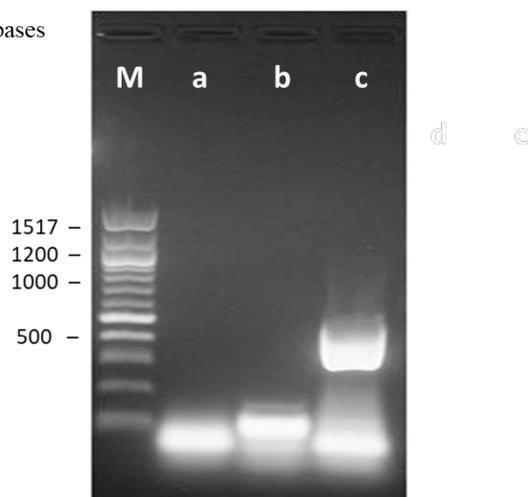


Figura 22- Análise eletroforética de produtos amplificados por RT-PCR com RT separadamente utilizando os primers P3 e P4 (tamanho esperado aproximadamente 491 bp): M – Marcador Quick Load 100bp DNA Ladder; a – Controlo negativo; b – Isolado 1042-2010; c – Isolado 39990-2017

3.2.1.3.3. Amplificação por RT-qPCR

A Figura 23 mostra o resultado do ensaio RT-qPCR com o RNA extraído de várias matrizes das amostras, 1042-2010 e 39990-2017. Este ensaio corrobora o resultado anteriormente obtido por RT-PCR convencional, apenas o macerado de órgãos apresentou um resultado positivo.

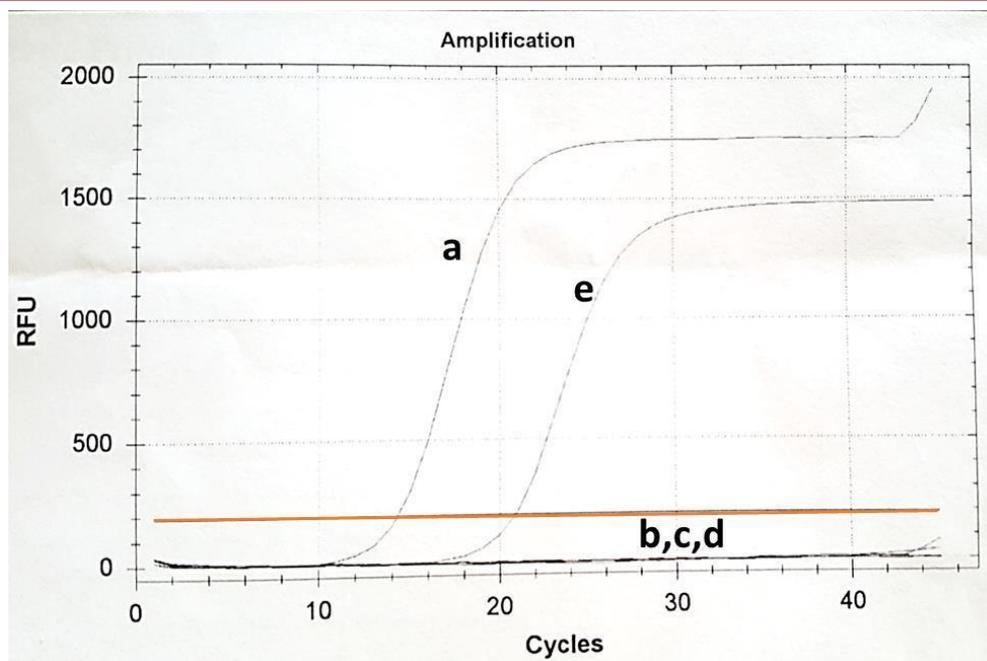


Figura 23– Detecção do IBDV por RT-qPCR, utilizando os primers P3 e P4 e a sonda FAM: a – Controlo positivo (vacina - BVR706); RNA extraído da amostra 1042-2010; b – baço, c - fígado, d – células FEPI, resultado negativo; RNA extraído da amostra 39990-2017, e –, macerado de fígados de embriões de pinto, resultado positivo.

3.2.2. Detecção de anticorpos anti-IBDV pelo método ELISA indireto

De um total de 310 amostras de soro de aves, 60 (19%) soros de galinhas reprodutoras foram testadas para anticorpos IBDV. Destes, 32% foram positivos, 65% foram negativos e 3% apresentaram resultado duvidoso (Figura 24).

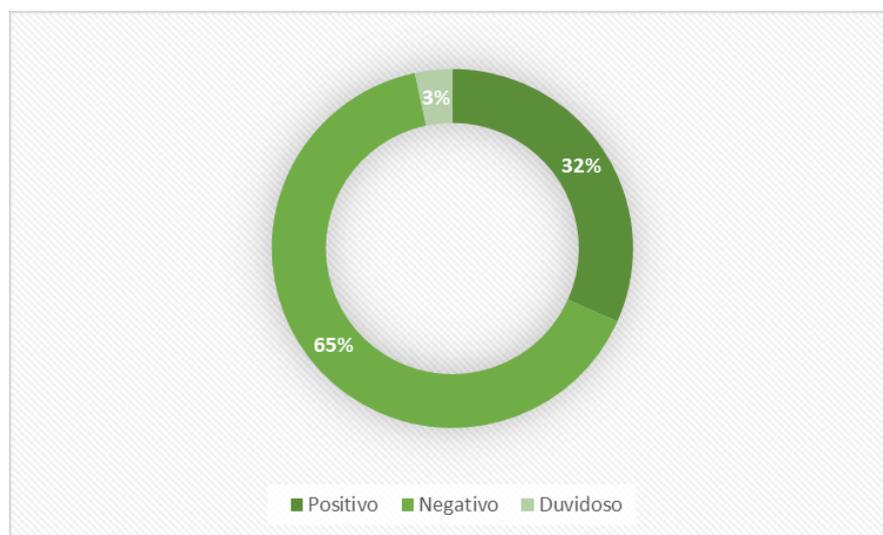


Figura 24- Gráfico representativo dos resultados relativos às galinhas reprodutoras

Num total de 100 soros (32%) de galinhas poedeiras, foram detetados 24% de soros positivos, 61% apresentaram resultado negativo e 15% resultado duvidoso (Figura 25).

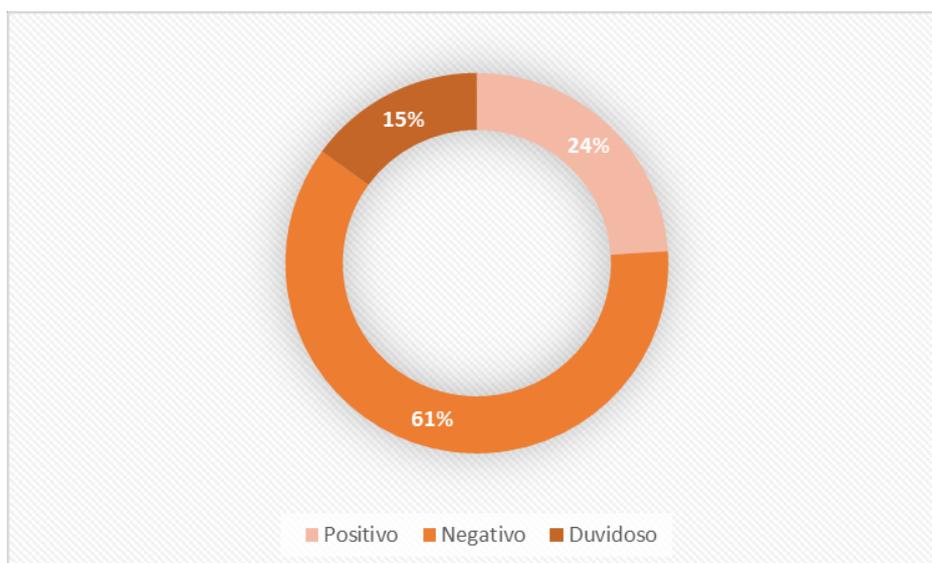


Figura 25- Gráfico representativo dos resultados relativos às galinhas poedeiras

De um total de 70 soros de frangos do campo testados, 94% apresentaram um resultado negativo, e apenas 3% apresentaram anticorpos anti-IBDV (Figura 26).

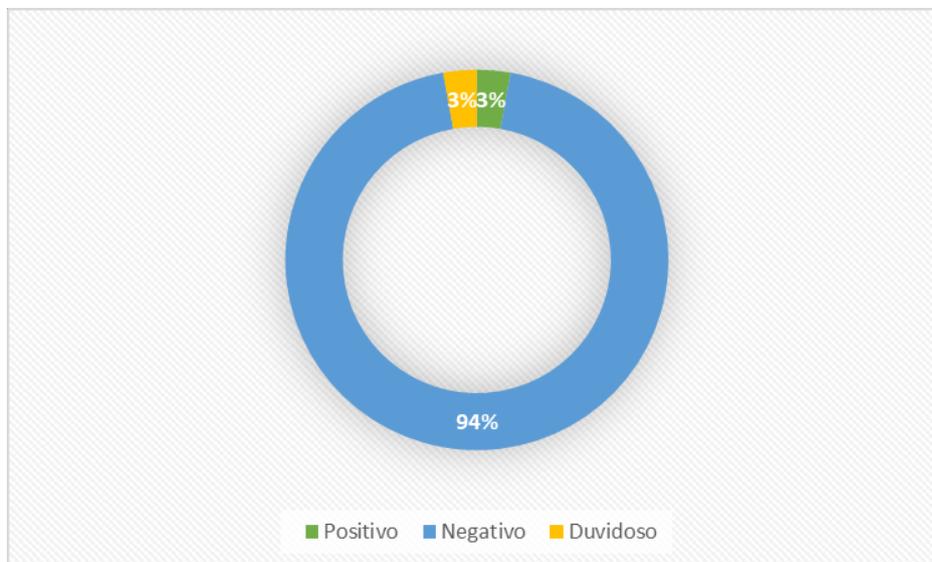


Figura 26- Gráfico representativo dos resultados relativos aos frangos do campo

Foram testados 40 soros de patos de engorda tendo sido detetados anticorpos anti-IBDV em três amostras (7%). As restantes amostras apresentaram resultado negativo ou duvidoso 90% e 3%, respetivamente (Figura 27).

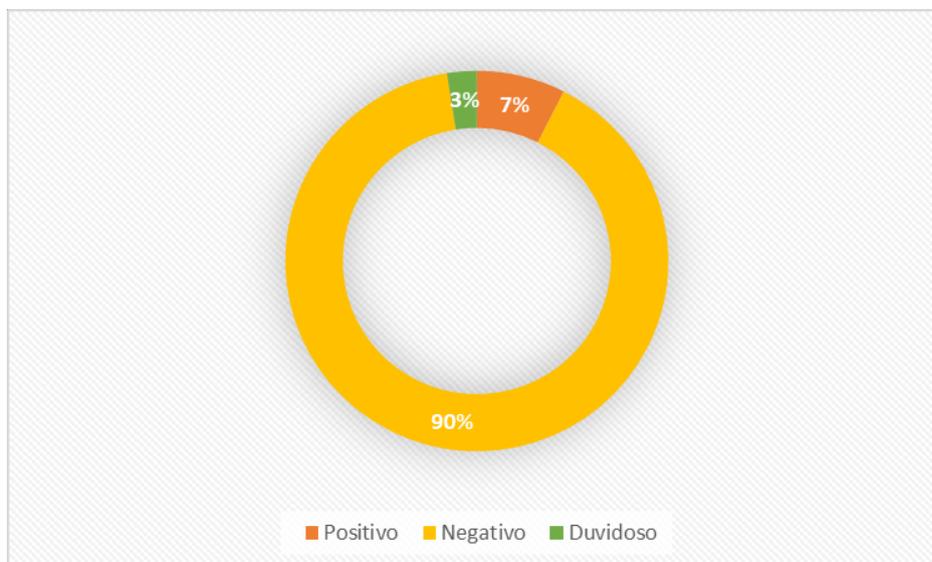


Figura 27 - Gráfico representativo dos resultados relativos aos patos de engorda



No grupo dos perus, todos os soros apresentaram resultado negativo

3.3. Discussão

Para o diagnóstico do IBDV pode recorrer-se a vários métodos, alguns deles podem ser usados em simultâneo permitindo um diagnóstico definitivo. São eles o isolamento e multiplicação em ovos embrionados e cultura de células; ELISA; seroneutralização; PCR; sequenciação e microscopia eletrónica, (Dubovi, 2011^a; OIE, 2016).

Os métodos utilizados neste trabalho foram o isolamento e multiplicação do vírus em ovos embrionados e em cultura de células primárias FEPI, seguido de RT-PCR e RTqPCR. Os métodos moleculares permitiram confirmar que a amostra 39990-2017 é positiva para IBDV.

O isolamento e multiplicação do IBDV correspondeu às expectativas, após uma passagem em ovos embrionados e uma passagem em células FEPI foi possível isolar e multiplicar o vírus. O isolamento em ovos embrionados foi confirmado através da observação de lesões hemorrágicas nos embriões, conforme descrito na literatura, e ainda através da amplificação do gene VP2 por RT-PCR e RT-qPCR, (OIE, 2016; Lawal et al., 2017) . Foram também usadas outras culturas celulares, nomeadamente VERO e LMH. Apesar de estar descrito na literatura a multiplicação do IBDV em células de linha como as VERO (Kibenge et al., 1988), neste trabalho não foram obtidos resultados positivos, não se tendo observado efeito citopático, possivelmente por incapacidade de adaptação do vírus a este tipo de células (células de linha) (Carvalho et al., 2004).

O EC observado, arredondamento e destacamento das células, pode confundir-se com células normais soltas em suspensão ou com o efeito citotóxico do inóculo sobre as culturas, em particular do material proveniente de órgãos naturalmente conspurcados como a BF e o intestino, por esse motivo é importante recorrer a testes moleculares para confirmação, como o RT-PCR. Concluindo, o método da observação do EC não é específico e é subjetivo, uma vez que pode confundir-se EC de diferentes vírus (birnavírus com adenovírus por exemplo), sendo necessário complementar a observação ao microscópio com outros métodos de diagnóstico como o RT-PCR, ELISA, seroneutralização (Dubovi, 2011b).

A observação ao microscópio ótico da cultura celular FEPI 48h e 72h após a inoculação com as amostras em estudo, permitiu observar a evolução do efeito citopático, que por sua vez permitiu suspeitar da presença de vírus nas culturas. A Figura 18 mostra o efeito

citopático característico dos birnavírus, arredondamento/ destacamento das células e reovírus aviários, formação de sincícios. A infeção concomitante de IBDV e reovírus é frequente em galinhas (Shat et al., 2014).

O isolamento permite a multiplicação de vírus, contudo este tem que ser identificado por outros métodos, como RT-PCR, sequenciação, seroneutralização ou ainda por microscopia eletrónica. O isolamento de vírus permite a sua caracterização biológica, sendo por isso vantajoso (OIE, 2016).

A deteção do vírus, nos macerados de órgãos e na cultura de células FEPI inoculadas, foi feita por RT-PCR e RT-qPCR. A deteção do vírus por RT-PCR é um método bastante utilizado no diagnóstico da IBD, uma vez que não é necessário isolamento prévio do vírus (OIE, 2016). O IBDV foi apenas identificado na amostra 39990-2017.

A sequência de métodos utilizados permitiu confirmar que o vírus que se isolou e multiplicou era de facto um birnavírus, no caso da amostra 39990-2017, o mesmo não aconteceu com a amostra 1042-2010, que apesar de ter apresentado um EC semelhante ao de birnavírus, como se observa na Figura 20, apresentou resultado negativo nos testes moleculares de amplificação, RT-PCR (dois métodos) e RT-qPCR. Através de posteriores testes moleculares, descobriu-se que se tratava de um adenovírus, contudo com características muito semelhantes ao birnavírus no que diz respeito ao EC, como referido anteriormente. Uma outra explicação para resultado negativo para IBDV poderá ser a incorreta extração de material genético na extração do RNA destas amostras, neste caso, o meio utilizado na cultura de células FEPI, HepatoZYME-SFM (ThermoFisher, Massachusetts, USA), por se tratar de um meio rico em proteínas, pode ter interferido com a extração de RNA. O controlo negativo funcionou bem em ambos os métodos, podendo concluir-se que não houve contaminação na adição dos reagentes e preparação da reação de amplificação.

O teste ELISA não permite, atualmente, fazer a distinção entre anticorpos induzidos por estirpes patogénicas ou por estirpes vacinais (Hnasko, 2015). Neste trabalho, não se fez esta distinção, contudo pressupôs-se que os anticorpos detetados são contra estirpes vacinais, dado que a vacinação se pratica regularmente na indústria avícola, em Portugal. Verifica-se uma maior percentagem de resultados positivos no grupo das galinhas reprodutoras e poedeiras. Estes resultados corresponderão a anticorpos induzidos pela



vacinação destas aves contra o IBDV durante a recría. No grupo dos frangos de campo, verifica-se uma baixa percentagem de resultados positivos, uma vez que, neste sector da avicultura, a vacinação não é prática comum. No grupo dos patos de engorda, foram detetados 3 animais com resultado positivo, sendo que os anticorpos detetados correspondem possivelmente a anti-IBDV serotipo II, pelo que não são relevantes, uma vez que apenas os vírus do serotipo I são patogénicos para as galinhas, podendo causar imunossupressão nas mesmas. No grupo dos perus, não se verificou nenhum resultado positivo. Relativamente aos resultados duvidosos, não foram efetuadas novas colheitas nem utilizados outros métodos de confirmação.

O RT-PCR e o teste ELISA são métodos muito práticos, rápidos e permitem o rastreio de grande número de amostras em simultâneo. Contudo, um resultado positivo no RT-PCR nem sempre é sinal de infeção, pois o RNA viral pode ser detetado em alguns tecidos após o final da virémia o que, não significa que o animal esteja doente. É necessário complementar o resultado do RT-PCR com outros dados, como a história, sinais clínicos e lesões relativos ao animal, para se poder chegar a um diagnóstico final confiável, (VetFolio, 2008; OIE, 2016; Dilnessa & Zeleke, 2017).

4. Expressão e purificação da proteína VP2 em *E. coli*

Neste trabalho procedeu-se à produção da proteína recombinante VP2 em *Escherichia coli* que poderá ser utilizada como antígeno vacinal ou como antígeno para qualquer teste serológico de diagnóstico. Para tal recorreu-se à clonagem do gene vp2 completo ou truncado (vp2t) do IBDV a partir do isolado nacional 39990-2017. O fragmento do gene foi amplificado por RT-PCR.

A metodologia inclui uma primeira clonagem em células XLGold utilizando o plasmídeo *Pcr 2.1*, recorrendo ao kit *The Original TA Cloning Kit* (Invitrogen, Carlsbad, California, USA). Seguiu-se uma segunda clonagem em células XLGold recorrendo a um vetor de expressão, o plasmídeo pET 28a(+). A produção e expressão da proteína recombinante foi realizada em células JM109. Seguiu-se a purificação da proteína a partir dos corpos de inclusão recorrendo ao método descrito por Bowden et al. 1991 e, ou pelo método IMAC. A análise da proteína recombinante foi realizada por SDS-PAGE, ELISA indireto e *Immunoblot*.

A utilização do plasmídeo *Pcr 2.1* tem a vantagem de permitir a inserção direta de produtos de PCR amplificados pela Taq polimerase, sem ser necessário recorrer à utilização de ligases ou *primers* com sequências específicas de alvos de ligação. Isto pode ser explicado pelo facto de a Taq polimerase apresentar atividade de terminal transferase, que adiciona desoxiadenosina (A) à extremidade 3' dos produtos de PCR, o que facilita a ligação destes ao plasmídeo *Pcr 2.1*, uma vez que este, quando linearizado possui extremidades coesivas 3', constituídas por um resíduo de timina (T) (Fig. 13). O vetor *Pcr 2.1* utilizado contém genes de resistência à kanamicina e à ampicilina. O local de clonagem múltipla está inserido no fragmento do gene *lacZ* (β -galactosidase) de *E. coli*.

(Invitrogen, 2013).

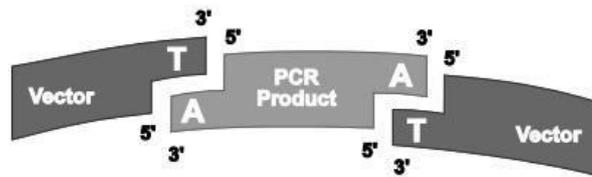


Figura 28- Diagrama demonstrativo da inserção do produto amplificado no vetor Pcr 2.1, do TA cloning Kit (Invitrogen, 2013).

Esta primeira clonagem pode ser monitorizada através do sistema da β -galactosidase e 5bromo-4-cloro-3-indoxil- β -D-galactopiranosídeo (X-Gal) permite visualizar se a clonagem foi bem-sucedida em culturas da bactéria num meio de cultura apropriado. O isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) é um indutor da β -galactosidase e o X-Gal é um substrato cromogénio que, quando hidrolisado pela β -galactosidase, forma um precipitado azul. Se o fragmento de DNA em estudo estiver inserido no local de clonagem, a região *lacZ* está interrompida, sendo incapaz de produzir a subunidade α da enzima β -galactosidase, razão pela qual as colónias mantêm a sua cor normal. Os plasmídeos que não tenham o fragmento inserido no local de clonagem, produzem a subunidade α que juntamente com a subunidade Ω codificada pela *E. coli* hidrolisa o XGal, dando origem a colónias de cor azul. A cor azul indicará que os plasmídeos não têm o fragmento (vp2) inserido no local de clonagem. A cor normal, branca, indicará que o fragmento (vp2) está inserido no local de clonagem (Scientific, 2016).

4.1. Materiais e métodos

4.1.1. Amplificação do gene vp2 de uma estirpe do IBDV isolada em Portugal

A extração de RNA viral, a partir de um macerado de BF e fígado de embriões de pinto inoculados com IBDV (39990-2017), foi realizada com o kit RNeasy, Qiagen (Hilden, Germany), de acordo com as instruções do fabricante.

Seguiu-se a produção de cDNA através de uma reação de transcriptase reversa, tendo sido utilizado o kit *Expand Reverse Transcriptase* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), de acordo com as instruções do fabricante. A tabela seguinte (Tab.6) mostra sob que condições foi realizada.

Tabela 7- Condições da reação de transcrição reversa

<i>Reagentes</i>	<i>Volume (µL)</i>	<i>Programa</i>
<i>RNA</i>	5	• 65 °C durante 10 min; • 0 °C até passo seguinte
<i>Primers hexâmeros</i>	1 (50µM)	
<i>H₂O</i>	5	
<i>Buffer</i>	4	• 30 °C durante 10 min; • 42 °C durante 45 min; • 0 °C até utilização na amplificação
<i>DTT 100mM</i>	2	
<i>dNTPs</i>	2 (1mM each)	
<i>RT</i>	1	

DTT – 1,4 Ditiotreitól 100 mM; dNTPs - desoxirribonucleotídeos fosfatados; RT – enzima transcriptase reversa

De modo a obter as sequências nucleotídicas do gene vp2 completo (vp2) e truncado (vp2t) do vírus IBD, procedeu-se à sua amplificação por RT-PCR com os *primers* IBDVvp2t-F-Eco 5' – AAA **AGA ATT CAT** GGT CCT TCT GAT GCC AAC AAC C – 3' (NZytech-NZY, Lisboa, Portugal), IBDV-vp2t-R-Xho 5' – AAA **ACT CGA GAA** ATC TGT CAG TTC ACT CAG G – 3' (NZytech-NZY, Lisboa, Portugal) e IBDV-vp2F-Eco 5' – AAA **AGA ATT CAT** GAC RAA CCT GCM AGA TCA AAC – 3' (NZytech-NZY, Lisboa, Portugal), IBDV-vp2-R-Xho 5' – AAA **SCT CGA GAA** CAG CTA TCC TCC TTA KGG CCC – 3' (NZytech-NZY, Lisboa, Portugal) respetivamente. O local de reconhecimento das enzimas *EcoRI* (New England Biolabs Inc., Ipswich, Massachusetts, EUA) e *XhoI* (New England Biolabs Inc., Ipswich, Massachusetts, EUA) foi introduzido na sequência dos *primers*, aquando da sua construção. (assinalados a negrito).

A reação de amplificação foi realizada com o kit Expand High Fidelity PCR System (Roche Applied Science, Mannheim, Germany), de acordo com as indicações do fabricante. Após a ativação da Taq polimerase a 95 °C durante 2 min, a amplificação decorreu em 50 ciclos (95 °C 30 s; 60 °C vp2 e 54 °C vp2t 30 s; 72 °C 2 min), por fim seguiu-se uma extensão final a 72 °C 10 min.

A reação de amplificação do gene pretendido foi verificada por análise eletroforética em gel de agarose (1% p/v, tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1x] a 110 V, durante 50 minutos.

Após visualização do gel, sob luz UV, a banda foi excisada e purificada utilizando o kit NZytech-NZY Gelpure (NZytech, Lisboa, Portugal), de acordo com as instruções do fabricante.

4.1.2. Clonagem, transformação e seleção de clones recombinantes

Foram utilizadas as células XL-Gold (Stratagene, USA) para transformação com o plasmídeo *Pcr 2.1* – vp2t. As células XL-Gold são uma estirpe laboratorial de *Escherichia coli* utilizada especificamente para a transformação.

Previamente à ligação e transformação as células XLGold foram tornadas competentes. Por competência entende-se processo através do qual são criados poros na membrana das células (*E. coli*), de modo a facilitar a entrada do plasmídeo. Para tal, procedeu-se à adição de meio LB (Luria Broth) às células (não competentes) que foram incubadas a 37°C com agitação (180 rpm) até a DO da cultura atingir o valor de 0,4 (aproximadamente 2 horas e 30 minutos). As células foram, depois, centrifugadas durante 5 minutos a 5000 x g. O *pellet* de células foi ressuscitado em tampão *transformation and storage solution* (TSS) (MgCl₂ 0,03g; PEG 0,3g; DMSO 150 microlitros; 2,85 ml LB). Seguiu-se um período de incubação de 10 minutos a 0 °C.

A ligação entre o produto amplificado (vp2 e vp2t) e o vetor *Pcr@2.1* (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) foi efetuada com o kit *The Original TA Cloning Kit* (Invitrogen, Carlsbad, California, USA), de acordo com as indicações do fabricante. Seguiu-se uma hora de incubação a 25 °C. Procedeu-se à transformação, a mistura de ligação (*Pcr@2.1*-vp2t e *Pcr@2.1*-vp2) foi adicionada às células competentes XLGold, seguindo-se um período de aproximadamente 20 minutos a 0°C.

Seguiu-se o choque térmico, a mistura de ligação e as células XLGold foram colocadas num banho a 42°C durante 35 segundos, seguindo-se um período de 2 minutos a 0°C. Após a adição do meio LB (10 g/l triptona, 10 g/l NaCl (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA), 5 g/l extrato de levedura) procedeu-se à incubação durante uma hora a 37°C com agitação (180 rpm)

O produto de transformação foi transferido para placas com meio LB Agar com 50 mg/ml kanamicina, contendo 40 µl X-Gal (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) e 40 µl IPTG (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA). Seguiu-se a incubação *overnight* a 37°C com agitação. As colónias brancas foram selecionadas e transferidas para frascos com LB e kanamicina (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) (Cf=0,05mg/µl) como mostra a imagem 12. Seguiu-se a incubação *overnight* a 37°C com agitação (180 rpm).



Figura 29 - Passagem das colónias para frascos com meio LB e kanamicina (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) (Cf=0,05mg/μl)

Prosseguiu-se para a extração do plasmídeo que teve início com uma centrifugação a 8000 ×g durante 2 minutos. Descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* no vortex. As amostras foram colocadas num banho a 100 °C durante 5 minutos e seguidamente ressuspendidas com tampão STET (NaCl 100mM, Tris-HCl (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA; Merck, Darmstadt, Alemanha) 10mM, pH 8.0, EDTA (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA) 1mM, Triton X-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) (5%), RNase (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) (Cf = 0,05mg/ml) e lisozima (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) (Cf = 0.2 mg/ml). As amostras foram novamente centrifugadas a 8000 ×g durante 10 minutos, o sobrenadante foi preservado e adicionado a 750 μL de isopropanol (Merck, Darmstadt, Germany). Centrifugou-se novamente a 8000 × g, 4 °C durante 15 minutos. Descartou-se o sobrenadante e o *pellet* foi ressuspendido em 50 μL de H₂O *RNase-free*.

As amostras foram digeridas com 0,5 µL da enzima *EcoRI* (20.000 U/ml), cujos locais de reconhecimento flanqueiam o local de inserção do gene de interesse, efetuando-se uma incubação de 1 hora a 37°C. Finalmente foi realizada uma eletroforese (1% p/V em TAE 1X) a 110V, durante 50 minutos.

4.1.3. Clonagem em vetor de expressão

O gene truncado vp2t que codifica a proteína VP2 foi subclonado no vetor pET-28a(+) (Novagen, Darmstadt, Germany), tendo sido utilizado o plasmídeo pET-28^a(+), contendo um fragmento do gene N3 que codifica a neuraminidase do subtipo 3 (N3) do vírus *Influenza A* (pET-N3t) existente no laboratório.

Procedeu-se à construção do vetor pET-vp2t. Os vetores *Pcr*®2.1 -vp2t e o pET-N3t foram clivados com 1 µL das enzimas *EcoRI* (20000 U/ml) e *XhoI* (20000 U/ml) em simultâneo, a 37 °C durante 2 horas. Confirmou-se por eletroforese em gel de agarose (1% p/v em TBE 1x) a 110 V, durante 50 minutos. Após visualização do gel, sob luz UV, as bandas de DNA correspondentes ao gene vp2t e ao pET-28^a(+) foram excisadas e purificadas utilizando o kit NZytechNZY Gelpure (NZytech, Lisboa, Portugal) (Fig.30 e 31).

Para a ligação entre o gene de interesse e o plasmídeo pET-28^a(+) foi adicionado um volume de 5 µL de vp2t e 2 µL do vetor, para que a proporção final fosse de três moléculas de insert para cada molécula de vetor. Estas proporções foram calculadas com base na intensidade das bandas correspondentes ao gene vp2t e do vetor pET-28^a(+) no gel de agarose e recorrendo à seguinte fórmula: $\text{ng vp2t} = \text{pb vp2t} \times 50 \text{ ng vetor} / \text{pb vetor} \times 3$. Para esta reação utilizou-se ainda 1U da enzima T4 DNA ligase (Invitrogen, Carlsbad, California, USA). Seguiu-se a incubação da mistura de ligação a 25 °C durante 1 hora e, a transformação das células XLGold. Foram repicadas 4 colónias, as que apresentavam maiores dimensões e procedeu-se à extração do DNA plasmídico de acordo com o método descrito anteriormente.

O DNA plasmídico extraído foi digerido com 0.5 µL da enzima *EcoO109I* (20.000 U/ml), durante 1 hora, a 37°C.

Seguiu-se uma eletroforese em gel de agarose (1% p/v em TBE 1x) a 110V, por 50 minutos. Procedeu-se de seguida à sequenciação, pelo método enzimático descrito por Sanger (1977), de modo a confirmar o sucesso da ligação entre o gene de interesse e o pET-28^a(+). Foram usados os *primers* universais do plasmídeo pET-28^a(+) T7 *promoter* e T7 *terminator* (NZytech, Lisboa, Portugal) e ainda os *primers* de diagnóstico do IBDV. A reação de sequenciação foi efetuada com o *BigDye Terminator cycle sequencing kit* (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA), de acordo com as indicações do fabricante. A sequência nucleotídica foi determinada no sistema automático *3130 Genetic Analyzer system* e o alinhamento foi efetuado com a ajuda do programa *SeqScape v2.5* (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA).

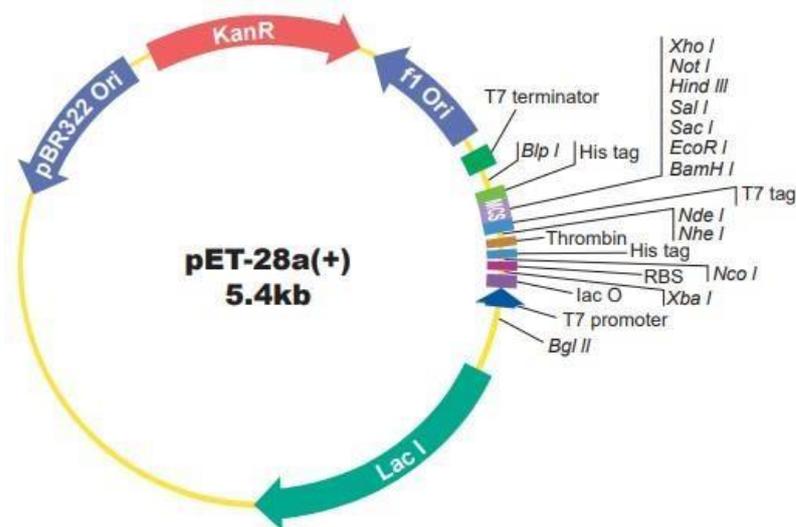


Figura 30 - Esquema representativo do vetor pET-28a(+) (GenScript, 2014).

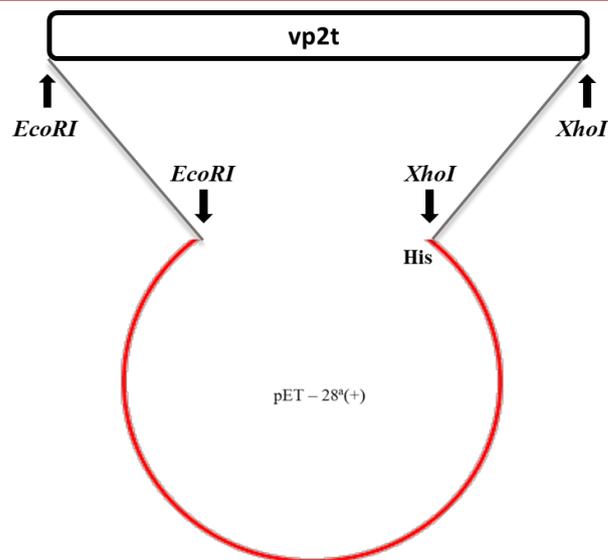


Figura 31 - Esquema representativo do vetor pET-vp2t, resultante da subclonagem do gene vp2t no vetor pET-28^a(+)

4.1.4. Produção e purificação de proteína recombinante

A estirpe *E. coli* JM109 (Stratagene, USA) foi utilizada para a transformação com o plasmídeo pET-vp2t e expressão da proteína recombinante. A transformação com o plasmídeo pET-vp2t ocorreu segundo o método descrito anteriormente. Uma das colónias obtidas foi transferida para meio líquido LB com kanamicina (Cf=0,05 mg/μl). Após um período de incubação de 1 hora a 37°C, foram transferidos 200 μl de pré-inóculo para 20 ml de meio LB (1/100). Seguiu-se um período incubação a 37°C durante 3 horas com agitação 180 rpm de modo a permitir o crescimento. Adicionou-se ao meio de cultura IPTG (*Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside*) Cf=0,001M) de modo a induzir a expressão da proteína recombinante. Efetuou-se um duplicado da mesma amostra, sem adição de IPTG como controlo negativo. Prosseguiu-se para um período de 4 horas nas mesmas condições. A purificação da proteína, a partir dos corpos de inclusão, foi realizada segundo o protocolo descrito por Bowden et al., 1991. Resumidamente, este método consiste na ressuspensão das células em tampão de lise (TL) (20mM Tris-HCl, pH=8,00; 100mM NaCl; 1mM EDTA), seguida de sonicação e adição de TL com 10μg/ml de DNase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA), TL com 0,2mg/ml de lisozima, TL com

2mg/ml de Desoxicolato de Sódio (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) e por fim TL com 0,5% de Trinton X-100 e 100mM de EDTA. A cada adição segue-se uma centrifugação a 12000 ×g, durante 10 minutos. Após três lavagens com H₂O, o *pellet* foi ressuspenso em 100µl de H₂O. Os vários sobrenadantes, resultantes das centrifugações, foram reservados ao longo de todo o processo.

O processo de purificação da proteína a partir dos corpos de inclusão foi também tentado por cromatografia de afinidade. Para o efeito foi realizado novo crescimento das células transformadas com o plasmídeo pET-*vp2t* de acordo com o método mencionado anteriormente. Para purificação da proteína por IMAC, utilizou-se o kit comercial *HiTrap affinity columns* (Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK) e ao kit *Ni-NTA Spin Kits* (Qiagen, Hilden, Germany), de acordo com as instruções do fabricante. Foram colhidas várias frações eluídas da coluna de níquel ao longo do processo de purificação da proteína recombinante, que foram depois analisados por SDS-PAGE.

4.1.5. Análise da proteína recombinante

A confirmação da expressão da proteína, cujo peso molecular é 13 kDa, foi realizada por *Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)* em que se utilizaram as concentrações de 5% e 12% de acrilamida/bis e acrilamida respetivamente para o gel de concentração (*stacking*) e de separação (*separating*), como mostra a Figura 32.

Seguiu-se eletroforese, que decorreu a 200V, durante 50 minutos (Fig.33). De seguida efetuou-se a revelação do gel de poliacrilamida, pelo método de coloração pela prata. Este método consiste primeiramente na imersão do gel em metanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) 50% (v/v) até este ficar reduzido a metade do seu tamanho inicial. É depois incubado numa solução de nitrato de prata (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) (Cf=0,2g/ml). A reação é revelada através da adição de uma solução de ácido cítrico (Merck, Darmstadt, Alemanha) 0,05% (v/v) e formaldeído (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) 0,019% (v/v). Por fim é adicionada uma solução de metanol 50% (v/v) e ácido acético (Merck, Darmstadt, Alemanha) 10% (v/v), para parar a revelação.

Para além do SDS-PAGE, foi realizado um teste ELISA indireto após purificação por IMAC, e ainda um *Immunoblot* com as frações eluídas durante o processo de purificação pelo método IMAC, e a partir dos sobrenadantes da primeira purificação a partir dos corpos de inclusão. Na técnica de *Immunoblot* foi utilizado um soro específico anti-IBDV. No teste ELISA indireto, os poços foram revestidos com os sobrenadantes colhidos ao longo do processo de purificação por IMAC. Foi utilizado um soro controlo (*pool* de soros positivos para IBDV) para averiguar se a proteína recombinante estava presente. Um resultado positivo neste teste, indicaria que os anticorpos anti-IBDV do soro controlo se ligariam ao antígeno, a proteína recombinante purificada. O *pool* de soros positivos para IBDV (soro controlo) foi previamente incubado com um *pellet* de células JM109 (*E. coli*), a 37°C durante 1 hora. As frações obtidas no processo de purificação por IMAC foram diluídos a 1:1000 com tampão carbonato/bicarbonato, o soro controlo a 1:500 com tampão de diluição de soros.

O teste ELISA foi efetuado de acordo com o método descrito anteriormente (capítulo 3.1.5.). A leitura das DO foi efetuada por espectrofotometria (450 nm).



Figura 32- Preparação do separating gel a 12% – SDS-Page

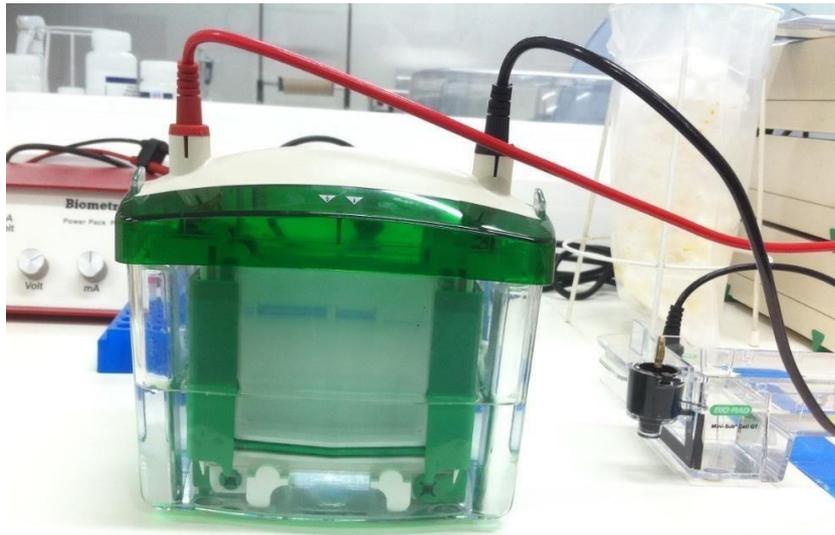


Figura 33- Eletroforese a 200V, 50 minutos do gel de poliacrilamida

4.2. Resultados e discussão

4.2.1. Amplificação do gene vp2 do IBDV

A amplificação do gene de interesse, vp2 e vp2t, foi confirmada por eletroforese como mostra a Figura 34. No poço 2 é possível a observação de uma banda pouco intensa com o peso molecular correspondente ao gene, vp2, com 1388bp. A banda de menor peso molecular corresponde a ligação inespecífica dos *primers*. No poço 3 observa-se uma banda com peso molecular correspondente ao gene vp2t, com 391bp. Em ambos os poços (2 e 3) é possível observar duas bandas intensas de menor peso molecular, que corresponderão a dímeros de *primers* que não se ligaram. Apesar de alguma amplificação inespecífica, visível principalmente no poço 2, e de arrastamento, derivado da degradação do material genético, pode concluir-se que a amplificação ocorreu com sucesso. A amplificação do fragmento ocorreu de acordo com o esperado e tal como está descrito noutros estudos (Amin & Jackwood, 2014; Lee et al., 2015).

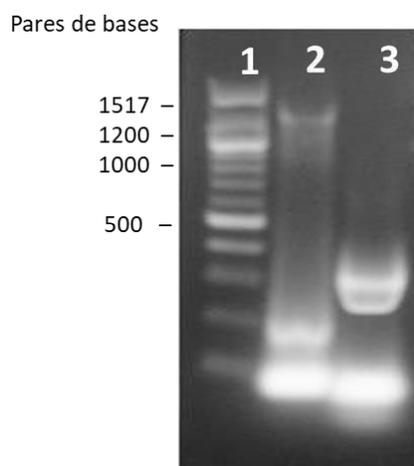


Figura 34 - Análise eletroforética do produto de amplificação, por RT-PCR, do gene vpP2 com os primers IBDV-vp2t-F-Eco (NZytech-NZY, Lisboa, Portugal), IBDV-vp2t-R-Xho (NZytechNZY, Lisboa, Portugal) e IBDV-vp2-F-Eco (NZytech-NZY, Lisboa, Portugal), IBDVvpP2-R- Eco:

1-Marcador, Quick Load 100bp DNA Ladder; 2-Gene vp2 (1388bp); 3-Gene vp2t (391bp).

4.2.2. Clonagem do gene vp2 truncado (vp2t)

Por não terem sido obtidas colónias, após repetidas tentativas do processo de transformação quando se utilizou o gene vp2 completo, optou-se por utilizar o gene vp2 truncado (vp2t). Isto pode explicar-se pelo facto de fragmentos mais pequenos serem mais fáceis de clonar (Alberts et al., 2002). A Figura 35 (seta vermelha), mostra as colónias azuis que cresceram após o período de incubação. A seta azul (Fig.35) mostra uma colónia branca que cresceu após a incubação (fragmento vp2t está inserido).

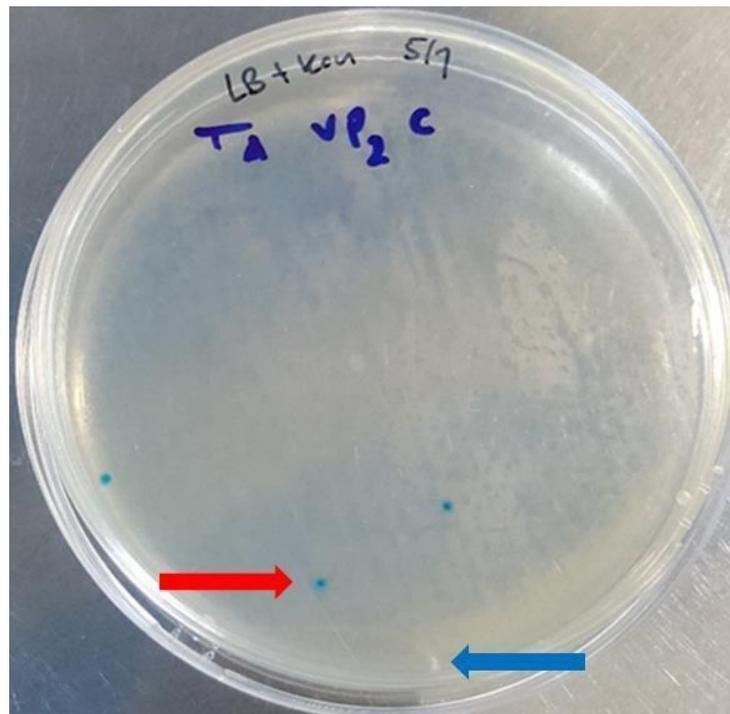


Figura 35 - Colónias azuis em células XLGold (E. coli) com o plasmídeo Pcr 2.1 -vp2t

4.2.3. Clonagem em vetor de expressão

A digestão dos vetores TA-*vp2t* e *pET-n3* com as enzimas *EcoRI* e *XhoI*, foi verificada por análise eletroforética como mostra a Figura 36. Nos poços 1 e 3 é possível observar uma banda correspondente ao gene de interesse, *vp2t* (391bp). Observa-se também uma banda de peso molecular superior (3900 bp) correspondente ao vetor *PCR 2.1* (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA). No poço 2, a banda de maior peso molecular corresponde ao vetor *pET-28^a(+)*, enquanto que a de menor peso corresponde ao gene *n3*. No poço 3, não se verificam diferenças em relação ao poço 1, pelo que o uso de um tampão diferente não alterou o processo de digestão dos vetores. Verifica-se algum arrastamento, que deverá corresponder a degradação do DNA (Life sciences, 2011).

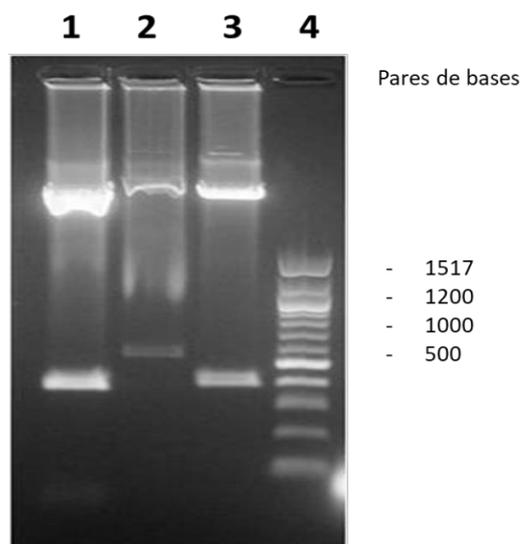


Figura 36- Análise eletroforética das amostras de pDNA, obtido a partir das células XLGold (*E.coli*), digeridas com as enzimas *EcoRI* e *XhoI*:

1 – Plasmídeo *Pcr 2.1*. -*vp2t* digerido com *EcoRI* e *XhoI*, a banda superior corresponde ao vetor *Pcr 2.1*. A banda inferior corresponde ao gene *vp2t* (391bp); 2 – Plasmídeo *pET-n3* digerido com *EcoRI* e *XhoI*, a banda superior corresponde ao vetor *pET-28a(+)* (5369bp). A banda inferior corresponde ao gene *n3*; 3 – Vetor *TA-*vp2t digerido com *EcoRI* e *XhoI* usando um tampão diferente; 4 – Marcador *Quick Load 100bp DNA Ladder***



Figura 37- Análise eletroforética dos produtos de purificação das bandas correspondente ao gene *vp2t* e ao vetor *pET-28^a(+)*, avaliação da intensidade das bandas correspondentes ao gene *vp2t* e ao vetor *pET-28^a(+)*:

1 – Banda correspondente ao gene de interesse, *vp2t* (391bp); 2 – Banda correspondente ao vetor *pET-28^a(+)* (5369bp)

Na Figura 38, é possível observar as colónias brancas que cresceram.

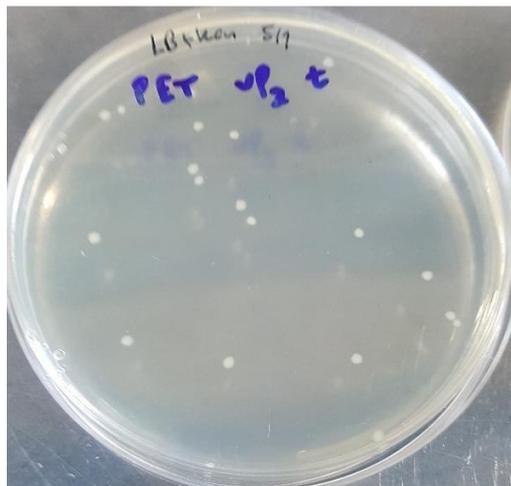


Figura 38- Colónias brancas (*JM109 – E.coli*) com o vetor *pET-vp2t*

Na análise eletroforética da Figura 39, a banda de peso molecular superior corresponde a DNA plasmídico (pDNA) não digerido. As restantes bandas estão de acordo com os resultados esperados, e correspondem aos pesos moleculares de 3192bp, 1674bp e 858bp, sendo que o gene de interesse, *vp2t* (391bp), estará inserido na banda de menor peso molecular (858bp). O tamanho do vetor *pET-vp2t* é de 5724bp, que corresponde ao peso do vetor *pET-28a(+)* (5369bp) mais o peso do DNA inserido, *vp2t* (391bp), subtraindo a

sequência clivada, e portanto, perdida, pelas enzimas de restrição *EcoRI* e *XhoI* (36bp). Verifica-se algum arrastamento, derivado da degradação de DNA. Este resultado permite concluir que a construção do vetor pET-*vp2t* foi efetuada com sucesso.

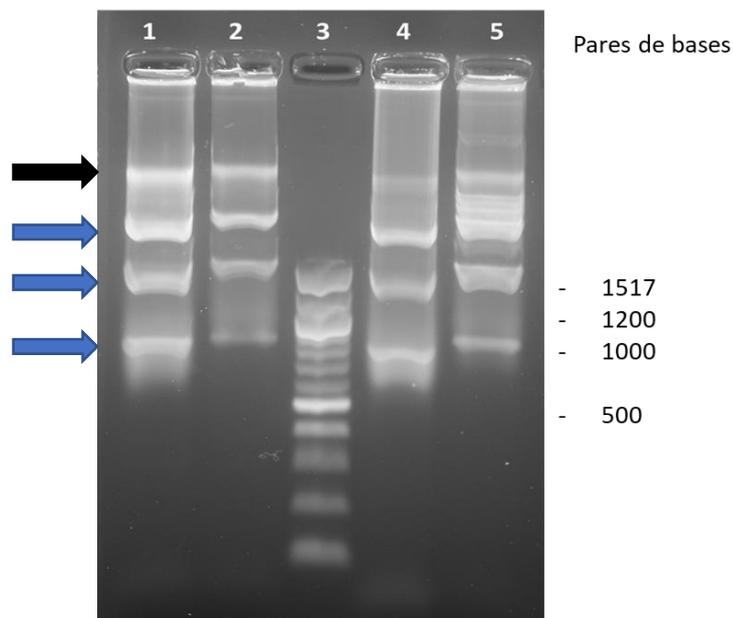


Figura 39- Análise eletroforética as amostras de pDNA, obtido em células XLGold (*E. coli*), digeridas com a enzima *Eco0109I*:

1, 2, 4 e 5 – Vetor pET-*vp2t* digerido com a enzima *Eco0109I*, proveniente de 4 colônias de células XLGold (*E. coli*) diferentes. A banda superior corresponde a pDNA não digerido (seta a negro). As restantes bandas correspondem aos pesos moleculares de 3192bp, 1674bp e 858bp (contém *vp2t*); 3 – Marcador Quick Load 100bp DNA Ladder.

A sequência completa do gene *vp2t* foi obtida por sequenciação segundo o método enzimático de *Sanger*, recorrendo aos *primers* universais para o vetor pET-28a(+) T7 *promoter* e T7 *terminator* e ainda aos *primers* de diagnóstico do IBDV P3 e P4 (Fig.40). A sequência obtida foi confirmada recorrendo ao *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST). Este programa informático compara as sequências de nucleótidos ou proteínas em estudo com sequências existente num banco de dados, *GenBank*, NCBI, e calcula a significância estatística.

ATGGTCCTTCTGATGCCAACAACCGGACCGGCGTCCAT TCCGGACGACACCCTGGAGAAG
CACACTCTCAGGTCAGAGACCTCGACCTACAATTGACTGTGGGGGACACAGGGTCAGGC
TAATTGTCTTTTCCCTGGAT TCCCTGGCTCAATTGTGGGTGCTCACTACACACTGCAGGG
CAATGGGAACTACAAGTTCGATCAGATGCTCCTGACTGCCAGAACCTACCGGCCAGTTAC
AACTACTGCAGGCTAGTGAGTCGGAGTCTCACAGTGAGGTCAAGCACACT TCCTGGTGGC
GTTTATGCACTAAACGGCACCATAAACGCCGTGACCTTCCAAGGAAGCCTGAGTGAAC
TACAGAT **TT**CTCGAG

- Sequência do gene VP2t
- Bases aleatórias para colocar o gene VP2t em fase de leitura com caudas de histidina
- Sequência de reconhecimento da enzima XhoI

Figura 40- Sequência do gene *vp2t* clonado no vetor *pET-28a(+)* obtida pelo método enzimático de Sanger, com os primers universais para o vetor *pET-28a(+)* T7 promoter e T7 terminator e os primers de diagnóstico para o IBDV P3 e P4

4.2.4. Análise da proteína recombinante

No gel da Figura 41, observa-se o resultado da análise de várias alíquotas colhidas ao longo da primeira purificação da proteína recombinante a partir dos corpos de inclusão. Os resultados foram inconclusivos, e a proteína de interesse não foi observada. O marcador não se separou bem ao longo do gel, por ter sido utilizada excessiva quantidade (15 µl) (Mahmood & Yang, 2012). Estes resultados podem dever-se a erros no processo de purificação, ou a quantidade de amostra utilizada insuficiente.

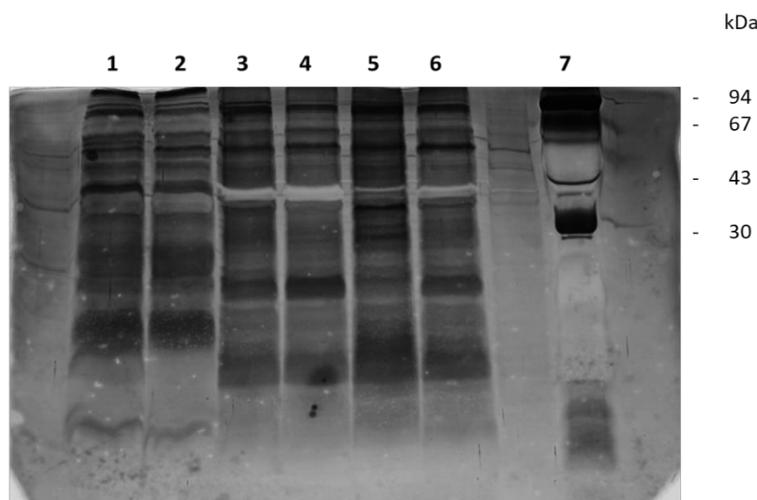


Figura 41- Fotografia do gel de poliacrilamida, SDS-Page, (gel de separação 12% e gel de concentração 4%), após eletroforese (200V, 50 min.) corado pela prata para análise da proteína purificada a partir dos corpos de inclusão das células de expressão JM109:

1, 3 e 5 – Proteínas dos sobrenadantes resultantes do processo de purificação a partir dos corpos de inclusão das células JM 109 (*E. coli*); Controlo negativo (sem indução da expressão), sem IPTG; 2, 4 e 6 – Proteínas dos sobrenadantes resultantes do processo de purificação a partir dos corpos de inclusão das células JM109 (*E. coli*), com IPTG (Cf=0,001M); 7 - Marcador molecular *Electrophoresis calibration kit* (Pharmacia)

De modo a confirmar este resultado recorreu-se à técnica de *Immunoblot*, uma vez que esta técnica é mais sensível que o SDS-PAGE, tendo sido utilizado um soro específico anti-IBDV, contudo não foram obtidos resultados positivos. O *Immunoblot* permite avaliar a quantidade de proteína presente (Mahmood & Yang, 2012). Está descrita a deteção da proteína recombinante VP2 através desta técnica, ainda que tenham sido utilizadas outras bactérias na clonagem (*Lactococcus lactis*) (Liu et al., 2018), ou mesmo com *E.coli* (Wenqiang et al., 2015b), contudo neste trabalho não foram obtidos resultados. Este método foi efetuado apenas a partir de amostras da primeira purificação a partir dos corpos de inclusão, em que não se tinha observado banda correspondente à proteína VP2t (13kDa) no gel de poliacrilamida (Fig.41), o que pode justificar o facto de não terem sido obtidos resultados positivos.

Foi efetuado novo crescimento, seguido da purificação da proteína. Foram utilizados dois volumes de amostra (último sobrenadante do processo de purificação), nomeadamente 5 e

10 μ l. Nos poços a) e b) utilizou-se 10 μ l, nos poços d) e e) utilizou-se 5 μ l. Nos poços a) e d) não foi adicionado IPTG, funcionando como controlo negativo. Nos poços b) e e) foi adicionado IPTG (Fig.42).

No poço e) a banda correspondente à proteína de interesse encontra-se destacada a vermelho. Apenas no poço e) da Figura 42, em que foi adicionado IPTG, se observa a banda correspondente à proteína com o peso molecular esperado, o que permite concluir que, de facto, a proteína recombinante Vp2t foi produzida. Num estudo de Wenqiang et al., 2015, a proteína recombinante foi obtida e a confirmação da expressão da mesma foi obtida por SDS-PAGE e *Western-Blot* (Wenqiang et al., 2015b).

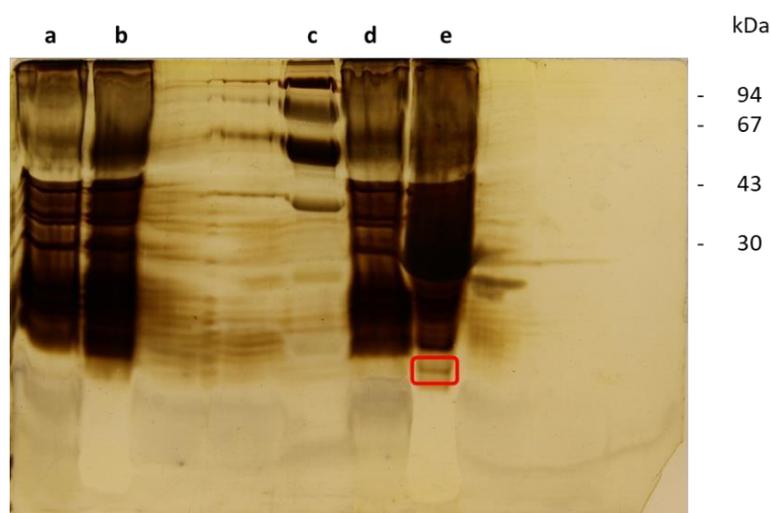


Figura 42- Fotografia com filtro UV do gel de poliacrilamida, SDS-Page, (gel de separação 12% e gel de concentração 4%), após eletroforese (200V, 50 min.) corado pela prata para visualização da proteína purificada a partir dos corpos de inclusão das células de expressão JM109:

a, d – Proteínas purificadas a partir dos corpos de inclusão das células JM 109 (*E. coli*); Controlo negativo, sem indução com IPTG. Cada poço tem volumes de amostra de 5 e 10 μ l respetivamente; b, e - Proteína recombinante VP2t, 13kDa, purificada a partir dos corpos de inclusão das células JM 109 (*E. coli*). IPTG (Cf=0,001M). Cada poço tem volumes de amostra de 5 e 10 μ l respetivamente; c - Marcador molecular *Electrophoresis calibration kit*

(Pharmacia)

Não foram realizados os testes ELISA nem *Immunoblot* para confirmar este resultado (Fig.42).

Foi efetuada uma nova repetição do processo de produção e purificação da proteína. Utilizou-se como amostra o último sobrenadante do processo de purificação. Nos poços 3

e 4 foi adicionado IPTG. Nos poços 2 e 5 não foi adicionado IPTG, funcionando como controlo negativo. É possível observar as bandas correspondentes à proteína de interesse, VP2, apenas nos poços onde foi adicionado o IPTG (Fig.43).

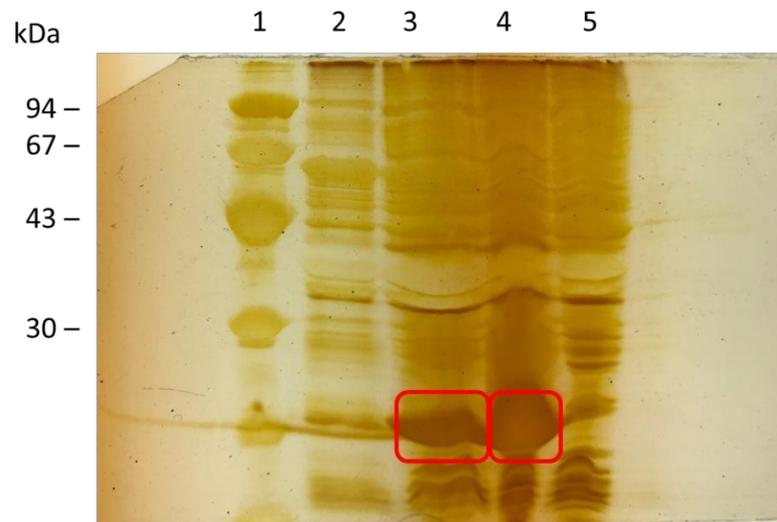


Figura 43 - Fotografia com filtro UV do gel de poliacrilamida, SDS-Page, (gel de separação 12% e gel de concentração 4%), após eletroforese (200V, 50 min.) corado pela prata para análise da proteína purificada a partir dos corpos de inclusão das células de expressão JM109:

1-Marcador molecular Electrophoresis calibration kit (Pharmacia); 2 e 5 - Proteínas purificadas a partir dos corpos de inclusão das células JM 109 (E. coli); Controlo negativo, sem indução com IPTG.; 3 e 4 - Proteína recombinante VP2t, 13kDa, purificada a partir dos corpos de inclusão das células JM 109 (E. coli), IPTG (Cf=0,001M).

A purificação da proteína recombinante VP2 do IBDV pelo método de cromatografia de afinidade está descrita na literatura, (Wenqiang et al., 2015b). Contudo neste trabalho não foram observados resultados positivos no SDS-PAGE (banda correspondente à proteína de interesse), no teste ELISA, nem no *Immunoblot* quando utilizado o método IMAC.

Apesar da proteína de interesse ter sido observada no gel de poliacrilamida, são necessárias melhorias no processo de purificação e novas tentativas. Contudo, não dispondo de tempo e de material, não foi possível a repetição do processo.

5. Conclusão

Os objetivos deste trabalho foram atingidos, abordaram-se metodologias de isolamento e multiplicação de birnavírus em aves, assim como de identificação através de métodos de biologia molecular. Foram ainda detetados anticorpos anti-IBDV em soros de aves. A proteína recombinante foi de facto produzida e identificada por SDS-PAGE, contudo, como referido anteriormente, são necessários estudos futuros para que esta possa ser utilizada na imunização de aves e em métodos de diagnóstico do IBDV.

Com este estágio fiquei familiarizada com as metodologias mais utilizadas em virologia, como o isolamento, multiplicação e identificação de vírus. Apesar de ter sido direcionado para birnavírus das aves, consolidei conhecimentos e metodologias aplicáveis a outros vírus, sendo esta uma boa ferramenta para o futuro e para outros projetos de investigação que possa integrar.

A partir do vírus IBDV isolado em Portugal (amostra 39990-2017), foi possível a realização de metodologias como a deteção por RT-PCR e RT-qPCR, e ainda a produção de uma proteína recombinante (VP2). Recorrendo ao SDS-PAGE, foi possível verificar que a proteína foi produzida. Contudo não foram obtidos resultados positivos no teste ELISA e *Immunoblot*. Futuramente seria importante aperfeiçoar a técnica de purificação da proteína recombinante, principalmente pelo método de cromatografia de afinidade, assim como a repetição dos testes ELISA e *Immunoblot*. Isto permitiria a utilização da proteína recombinante para fins profiláticos e no diagnóstico.

A análise dos soros efetuada neste trabalho, permite concluir que de facto o vírus circula nas explorações avícolas em Portugal, no entanto presume-se que se trate do vírus vacinal. Não foi feita a distinção entre anticorpos induzidos por estirpes patogénicas e por estirpes vacinais, sendo necessários estudos futuros para melhor caracterizar a natureza destes anticorpos.

A deteção de RNA viral por RT-PCR é um método bastante utilizado no diagnóstico da IBD, uma vez que não é necessário isolar o vírus previamente. Para além disto, o isolamento do IBDV nem sempre é fácil de realizar. Na prática o diagnóstico laboratorial do IBDV passa pela deteção de anticorpos específicos contra o vírus, ou na deteção de vírus nos tecidos, recorrendo a métodos imunológicos como o ELISA, AGID para deteção de anticorpos, ou moleculares como o RT-PCR (OIE, 2016).

Bibliografia

- Al-tubuly, A. A. (1996). SDS-PAGE and Western Blotting. In *Clinical Bioinformatics* (Vol. 40, pp. 391–405).
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. (2002). Isolating, Cloning, and Sequencing DNA. In *Molecular Biology of the Cell* (4th ed.). New York: Garland Science. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26837/>
- Amin, O. G. M., & Jackwood, D. J. (2014). Identification and molecular analysis of infectious bursal disease in broiler farms in the Kurdistan Regional Government of Iraq. *Tropical Animal Health and Production*, 46(7), 1297–1301. <https://doi.org/10.1007/s11250-014-0643-0>
- Bachman, J. (2013). *Reverse-transcription PCR (RT-PCR)*. *Methods in Enzymology* (1st ed., Vol. 530). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420037-1.00002-6>
- Caterina, K. M., Frasca, S., Girshick, T., & Khan, M. I. (2004). Development of a multiplex PCR for detection of avian adenovirus , avian reovirus , infectious bursal disease virus , and chicken anemia virus, 18, 293–298. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2004.04.003>
- Chang, Y., Li, H., & Sun, H. (2017). Immobilized Metal Affinity Chromatography (IMAC) for Metalloproteomics and Phosphoproteomics. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803814-7.00009-5>
- Cient, R., Veterin, F. D. E. M., & Xivn, A. (2016). APLICAÇÕES DAS TÉCNICAS DE PCR NO DIAGNÓSTICO DE DOENÇAS INFECCIOSAS DOS ANIMAIS Dionei Joaquim HAAS 1 , Ana Caroline Doyle TORRES 1 RESUMO.
- CUSABIO. (2017). Applications of recombinant proteins. Retrieved September 12, 2018, from <https://www.cusabio.com/c-20272.html>
- Dilnessa, T., & Zeleke, H. (2017). Cell Culture , Cytopathic Effect and Immunofluorescence Diagnosis of Viral Infection, 2(1), 1–8.
- Edward J. Dubovi. (2011a). Fenner's Veterinary Virology. In N. James MacLachlan (Ed.), *Fenner's Veterinary Virology* (Fourth, pp. 3-14-298). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-375158-4.X0001-6>
- Edward J. Dubovi. (2011b). Virus replication - recognition of viral Growth in Culture.

-
- In *Veterinary virology* (pp. 22–24). Elsevier.
- F. Kibenge, A. Dhilon, R. Russel (1988). Growth of serotypes I and II and variant strains of infectious bursal disease virus in Vero cells. *Avian diseases*, (pp.298-303).
- Fermentas Life sciences. (2011). Troubleshooting Guide for DNA Electrophoresis, 447–452.
- He, Z., Chen, X., Fu, M., Tang, J., Li, X., Cao, H., ... Zheng, S. J. (2017). Infectious bursal disease virus protein VP4 suppresses type I interferon expression via inhibiting K48-linked ubiquitylation of glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ). *Immunobiology*, (October), 0–1.
<https://doi.org/10.1016/j.imbio.2017.10.048>
- Healthcare, G. E. (2011). Western Blotting Principles and Methods.
- Hematian, A., Sadeghifard, N., & Mohebi, R. (2016). Traditional and Modern Cell Culture in Virus Diagnosis. *Osong Public Health and Research Perspectives*, 7(2), 77–82. <https://doi.org/10.1016/j.phrp.2015.11.011>
- Hnasko, R. (2015). ELISA: Methods and Protocols. Humana Press.
- Invitrogen. (2013). TA Cloning ® Kit.
- T. Kobayashi, S. Mikami, S. Yokoyama, H. Imataka (2007). An improved cell-free system for picornavirus synthesis. *Journal of Virological Methods* (pp. 182-188).
- Lardeux, F., Torrico, G., & Aliaga, C. (2016). Calculation of the ELISA 's cut-off based on the change-point analysis method for detection of Trypanosoma cruzi infection in Bolivian dogs in the absence of controls, *III*(March), 501–504.
<https://doi.org/10.1590/0074-02760160119>
- Lawal, N., Hair-Bejo, M., Arshad, S. S., Omar, A. R., & Ideris, A. (2017). Adaptation and Molecular Characterization of Two Malaysian Very Virulent Infectious Bursal Disease Virus Isolates Adapted in BGM-70 Cell Line. *Advances in Virology*, 2017, 1–19. <https://doi.org/10.1155/2017/8359047>
- Lee, H. J., Kim, J. Y., Kye, S. J., Seul, H. J., Jung, S. C., & Choi, K. S. (2015). Efficient self-assembly and protective efficacy of infectious bursal disease virus-like particles by a recombinant baculovirus co-expressing precursor polyprotein and VP4. *Virology Journal*, 12(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12985-015-0403-4>

-
- Liu, L., Zhang, W., Song, Y., Wang, W., Zhang, Y., Wang, T., ... Cui, H. (2018). Recombinant *Lactococcus lactis* co-expressing OmpH of an M cell-targeting ligand and IBDV-VP2 protein provide immunological protection in chickens. *Vaccine*, 36(5), 729–735. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.12.027>
- Mahmood, T., & Yang, P. (2012). Western Blot : Technique , Theory , and Trouble Shooting, 4(9), 7–12. <https://doi.org/10.4103/1947-2714.100998>
- Mawgod, S. A., Arafa, A. S., & Hussein, H. A. (2014). Molecular genotyping of the infectious bursal disease virus (IBDV) isolated from Broiler Flocks in Egypt. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*, 2(1), 46–52. <https://doi.org/10.1016/j.ijvsm.2014.02.004>
- MSD. (2006). Doença de Gumboro - como controlar? Retrieved June 9, 2018, from https://www.msds-animal-health.pt/noticias/2006-11-06_-_doen_a_de_gumboro__bursite_infecciosa_-_como_controlar_.aspx OIE.
- (2016). Infectious Bursal Disease.
- Protein Biology Resource Library, T. scientific. (2010). Overview of Protein Expression. Retrieved September 10, 2018, from <https://www.thermofisher.com/pt/en/home/life-science/proteinbiology/proteinbiology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierceproteinmethods/overview-protein-expression-systems.html>
- Qin, Y., & Zheng, S. J. (2017). Infectious Bursal Disease Virus-Host Interactions : Multifunctional Viral Proteins that Perform Multiple and Differing Jobs, 1–13. <https://doi.org/10.3390/ijms18010161>
- Ramadass, Parthiban, M., Chandrasekar, M., Nainar, M., & Raj, G. D. (2008). Development of single serum dilution ELISA for detection of infectious bursal disease virus antibodies. *Veterinarski Archiv*, 78(1), 23–30.
- Rani, S., & Kumar, S. (2015). Evaluation of infectious bursal disease virus stability at different conditions of temperature and pH. *Biologicals*, 43(6), 515–518. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2015.07.005>
- Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli* : advances and challenges, 5(April), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00172>

-
- S. Mikami, M. Masutani, N. Sonenberg, S. Yokoyama, H. Imataka (2006). An efficient mammalian cell-free translation system supplemented with translation factors. *Protein Expression and Purification*. (pp. 348-357).
- S. Mikami, T. Kobayashi, S. Yokoyama, H. Imataka (2006). A hybridoma-based in vitro translation system that efficiently synthesizes glycoproteins. *Journal of Biotechnology*. (pp.65-78).
- S. Mikami, T. Kobayashi, M. Masutani, S. Yokoyama, H. Imataka (2008). A human cell-derived in vitro coupled transcription/translation system optimized for production of recombinant proteins. *Protein Expression and Purification*. (pp.190-198).
- Scientific, T. (2016). 5 Ways to Screen for Recombinant Clones. Retrieved September 12, 2018, from <https://www.thermofisher.com/pt/en/home/brands/thermoscientific/molecularbiology/molecular-biology-learning-center/molecular-biologyresource-library/spotlightarticles/5-ways-screen-recombinant-clones.html>
- Shat, K. A. & Skinner, M. A. (2014). *Immuno evasion. Avian Immunology*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-396965-1.00016-9>
- Silva SEL; Ferreira HL; BA, Carvalho; TC, C. (2004). Susceptibility of Mammalian Cell Line for Isolation of IBDV from Clinical Samples. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 58, 65–69.
- T. Kobayashi, S. Mikami, S. Yokoyama, H. Imataka (2007). An improved cell-free system for picornavirus synthesis. *Journal of Virological Methods* (pp. 182-188).
- Ven den berg, T. P., Eterradossi, N., Toquin, D., & Meulemans, G. (2000). Infectious bursal disease (Gumboro disease). *Rev. Sci. Tech.*, 19(2), 527–543.
- VetFolio. (2008). Polymerase Chain Reaction Test Interpretation. Retrieved September 16, 2018, from <http://www.vetfolio.com/diagnostics/polymerase-chainreactiontest-interpretation>
- Videira, A. (2001). Clonagem de genes. In *Engenharia Genética, Princípios e Aplicações* (pp. 31–39). LIDEL.
- Wang, B., Duan, X., Fu, M., Liu, Y., Wang, Y., Li, X., ... Zheng, S. J. (2017). The Association of Ribosomal Protein L18 (RPL18) with Infectious Bursal Disease Virus Viral Protein VP3 Enhances Viral Replication. *Virus Research*, 18.



<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2017.12.009>

Wenqiang, Pang; Kunkun, Zhao; Xue, Jingjing; Geng, Xiaolin; Yuan, Yue; Yuxin, Huang; Yujie, Y., Yudan, Jin; Hui, Tian; Peng, Wu; Xiangdong, L., & Kegong, L. W. T. (2015). Purified Recombinant VP2 Protein Can Provide Complete Protection to very Virulent Infectious Bursal Disease Virus Challenge as a Subunit Vaccine, *I*, 39–42.