

JOSÉ SÉRGIO DE RESENDE

T636.089 69
R 433 p
1983



PATÓGENIA COMPARADA
DE DUAS AMOSTRAS BRASILEIRAS DO VÍRUS
DA BRONQUITE INFECCIOSA DAS GALINHAS (BIG)
EM AVES GNOTOBIÓTICAS (GN) E ISENTAS DE PATÓGENOS (SPF)

Tese apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Medicina Veterinária.

Área - Medicina Veterinária Preventiva.

U.F.M.G. - BIBLIOTECA UNIVERSITÁRIA



143698304 OK00

NÃO DANIFIQUE ESTA ETIQUETA

OK
02/103/04/00

BELO HORIZONTE - MINAS GERAIS

1983



MG 000185700

FICHA CATALOGRÁFICA

Resende, José Sérgio de, 1953-

R433p

Patogenia comparada de duas amostras brasileiras do vírus da bronquite infecciosa das galinhas (BIG) em aves gnotobióticas (GN) e isentas de patógenos (SPF). Belo Horizonte, Escola de Veterinária da UFMG, 1983.

74p. ilustr.

Tese, Mestre em Medicina Veterinária

1. Aves - Doenças. 2. Bronquite infecciosa - Galinhas. 3. Patogenia. I. Título.

CDD - 636.508 969 2

APROVADA EM: 23 / IX / 1983.


Prof. Dr. MAURÍCIO RESENDE
Orientador


Prof. Dr. ÉLVIO CARLOS MOREIRA
Co-orientador


Prof. Dr. ÊNIO CARDILLO VIEIRA


Prof. Dr. REGINO LEONARDO DE OLIVEIRA

À minha mulher Waldira Fernanda
e meu filho Henrique, dedico es
te trabalho.

AGRADECIMENTOS

- . Ao prof. Dr. Maurício Resende, do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG, pela valiosa orientação.
- . Ao prof. Dr. Ênio Cardillo Vieira, do Departamento de Bioquímica do ICB-UFMG, pela valiosa colaboração na obtenção e manutenção das aves GN e correção da tese.
- . Aos profs. Drs. Tasso Moraes e Santos e Jacques Robert Nicoli, do Departamento de Bioquímica do ICB-UFMG, pela acessoria e controle das aves GN.
- . Ao prof. Dr. Regino Leonardo de Oliveira, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária-UFMG, pelo inestimável apoio prestado durante a fase experimental e na correção da tese.
- . Aos profs. Drs. Élvio Carlos Moreira e Francisco Cecílio Viana, como Chefes do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária-UFMG, pela oportunidade concedida.
- . Aos profs. Drs. Luiz Flávio Souza Coelho e Orivaldo Alves da Rocha, do Departamento de Patologia Geral do ICB-UFMG, pela colaboração na histologia e microfotografia.

- . À profa. Dra. Maria Auxiliadora Roque de Carvalho, Chefe do Departamento de Microbiologia do ICB-UFMG, pelas condições oferecidas para a execução deste trabalho.
- . Ao prof. Dr. Eduardo Osório Cisalpino, Coordenador do Curso de Pós-Graduação do Departamento de Microbiologia do ICB-UFMG.
- . Ao prof. Dr. Ivan Barbosa Machado Sampaio, coordenador do Curso de Pós-Graduação da Escola de Veterinária-UFMG, pela atenção dedicada.
- . Aos funcionários Francisco Abílio do Nascimento, Ronilda Maria Nascimento e Marcelo Eustáquio da Silva, do Departamento de Bioquímica do ICB-UFMG, pela colaboração na produção e manejo das aves GN.
- . Aos funcionários José Atanásio Vieira e José de Paula, do Departamento de Patologia Geral do ICB-UFMG, pela colaboração na confecção dos cortes de órgãos e tecidos destinados à imunofluorescência e histologia.
- . Aos funcionários Roberto Altavilla e Marília Nadir dos Santos, do Departamento de Microbiologia do ICB-UFMG, pela colaboração durante a fase experimental.
- . À bibliotecária Eunice de Faria Lopes, pela colaboração na referenciação bibliográfica.
- . Aos funcionários, professores e colegas do Curso de Pós-Graduação, pelo agradável convívio.
- . Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) e Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES), pela bolsa de estudos concedida.

. A todos aqueles que tornaram possível a realização deste trabalho, o qual reflete a cooperação interdepartamental, envolvendo o Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária-UFMG e os Departamentos de Microbiologia e Bioquímica do ICB-UFMG.

Este trabalho contou com o apoio financeiro do Conselho Nacional de Pesquisa (Processo nº 40.2653/80) (CNPq) e Conselho de Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais.

RESUMO

Patogenia comparada de duas amostras brasileiras do vírus da bronquite infecciosa das galinhas (BIG) em aves gnotobióticas (GN) e isentas de patógenos (SPF).

Algumas características biológicas de duas amostras brasileiras do vírus da BIG foram estudadas em aves GN e SPF. As aves GN e SPF apresentaram sintomas clínicos, lesões macroscópicas e resposta sorológica diferentes, e lesões histológicas semelhantes, quando expostas a $10^{4.8}$ DIE₅₀ da amostra 208 e $10^{5.0}$ DIE₅₀ da amostra 29-78 do vírus da BIG. As aves GN infectadas com amostras 208 e 29-78 apresentaram: espirros menos frequentes, ausência de obstrução nasal e ronqueira pulmonar, quando comparadas com aves SPF. Não houve elevação da temperatura corporal e outros achados e sinais clínicos. Ambas amostras provocaram: congestão da mucosa dos cornetos e seios nasais infraorbitários, traqueíte discreta, presença de exsudato sero-mucoso (aves GN) e muco-purulento (aves SPF) nas áreas descritas acima e conjuntivite discreta. Os outros órgãos se apresentaram normais. A emergência dos achados de necropsia e clínicos nas aves GN ocorreu a partir de 24 e 48 horas após inoculação (h.a.i.) para a amostra 208 e de 48 e 72 h.a.i. para a amostra 29-78. Nas aves SPF, os achados de necropsia e clínicos ocorreram a partir de 24 h.a.i. para ambas amostras. Com base nas lesões histológicas, as duas amostras fo

ram exclusivamente epiteliotrópicas. Lesaram o epitélio da traquéia e dos brônquios das aves GN e SPF a partir de 24 h.a.i.. Houve descamação das células superficiais do epitélio seguida de hiperplasia epitelial e infiltração de células mononucleares na lâmina própria e no epitélio hiperplásico, além de hipertrofia dos centros linfóides germinativos presentes na lâmina própria do epitélio traqueal e bronquial. Na traquéia e nos brônquios das aves GN e SPF infectadas com amostras 208 e 29-78, células epiteliais infectadas com vírus da BIG foram detectadas pela imunofluorescência, entre 24 e 216 h.a.i.. Nos outros órgãos e tecidos estudados, não foram encontradas lesões histológicas e à imunofluorescência, não foram detectadas células infectadas com o vírus. O aparecimento de anticorpos precipitantes anti-vírus da BIG, tanto nas aves GN como SPF, ocorreu a partir de 168 e 216 h.a.i., para as amostras 29-78 e 208, respectivamente.



SUMÁRIO

| | PÁGINA |
|---------------------------------|--------|
| INTRODUÇÃO..... | 1 |
| REVISÃO DE LITERATURA..... | 5 |
| MATERIAIS E MÉTODOS..... | 14 |
| RESULTADOS..... | 34 |
| DISCUSSÃO..... | 53 |
| CONCLUSÕES..... | 65 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 67 |

LISTA DE FIGURAS:

| FIGURA | | PÁGINA |
|--------|---|--------|
| 1 | Traquêia (ave GN): 48 horas após inoculação com amostra 208 (imunofluorescência). | 43 |
| 2 | Traquêia (ave GN): 120 horas após inoculação com amostra 29-78 (imunofluorescência)... | 43 |
| 3 | Traquêia (ave GN controle): 24 dias de idade (corte histológico - H&E)..... | 44 |
| 4 | Traquêia (ave SPF controle): 24 dias de idade (corte histológico - H&E)..... | 44 |
| 5 | Traquêia (ave GN): 24 horas após inoculação com amostra 29-78 (corte histológico-H&E)..... | 45 |
| 6 | Traquêia (ave GN): 48 horas após inoculação com amostra 208 (corte histológico-H&E). | 45 |
| 7 | Traquêia (ave SPF): 48 horas após inoculação com amostra 29-78 (corte histológico-H&E)..... | 46 |
| 8 | Traquêia (ave GN): 72 horas após inocula- | |

| | | |
|----|--|----|
| | ção com amostra 29-78 (corte histológico-H&E)..... | 46 |
| 9 | Traquêia (ave GN): 96 horas após inoculação com amostra 208 (corte histológico - H&E)..... | 47 |
| 10 | Traquêia (ave GN): 144 horas após inoculação com amostra 29-78 (corte histológico-H&E)..... | 47 |
| 11 | Traquêia (ave SPF): 96 horas após inoculação com amostra 208 (corte histológico - H&E)..... | 48 |
| 12 | Traquêia (ave SPF): 120 horas após inoculação com amostra 29-78 (corte histológico - H&E)..... | 48 |
| 13 | Traquêia (ave SPF): 144 horas após inoculação com amostra 29-78 (corte histológico - H&E)..... | 49 |
| 14 | Traquêia (ave GN): 168 horas após inoculação com amostra 208 (corte histológico - H&E)..... | 49 |
| 15 | Traquêia (ave SPF): 360 horas após inoculação com amostra 208 (corte histológico-H&E)..... | 50 |
| 16 | Pulmão (ave GN): 120 horas após inoculação com amostra 208 (corte histológico - H&E) | 50 |
| 17 | Pulmão (ave GN): 144 horas após inoculação com amostra 29-78 (corte histológico - H&E).. | 51 |

| | | |
|----|--|----|
| 18 | Pulmão (ave SPF): 120 horas após inoculação com amostra 208 (corte histológico - H&E)..... | 51 |
| 19 | Pulmão (ave GN): 144 horas após inoculação com amostra 208 (corte histológico - H&E)..... | 52 |
| 20 | Pulmão (ave SPF): 192 horas após inoculação com amostra 29-78 (corte histológico - H&E)..... | 52 |



INTRODUÇÃO

A bronquite infecciosa das galinhas (BIG) tem sido descrita como uma infecção virótica aguda do sistema respiratório, altamente contagiosa, de importância econômica na indústria aviária e que apresenta algumas variações na intensidade dos sintomas e lesões clínicas (HOFSTAD, 1978).

Entre os prejuízos econômicos ressaltam-se a redução no ganho de peso (PRINCE et alii, 1962); queda de postura, deterioração da qualidade interna do ovo, fragilidade da casca e redução na eclodibilidade (SEVOIAN & LEVINE, 1957; McMARTIN, 1968; CRINION et alii, 1971a) e a "síndrome nefrite-nefrose" em frango de corte e aves na fase de recria (WINTERFIELD & HITCHNER, 1962).

A infecção pelo vírus da BIG pode se associar a uma alta morbidade e, em algumas circunstâncias, também a uma alta mortalidade. Nas aves jovens, as lesões mais graves são observadas no sistema respiratório (DELAPLANE & STUART, 1939). As aves adultas que tem a infecção apresentam discreta sintomatologia respiratória e após uma queda na postura, a produção de ovos eleva-se sem nunca alcançar os níveis considerados normais (BROADFOOT & SMITH, 1954).

Existem diversos sorotipos do vírus da BIG. O número exato ainda não é conhecido e uma ave exposta a um sorotipo pode experimentar infecção por outro sorotipo (HOFSTAD, 1975).

Quanto à patogenicidade das amostras, muitos auto

res tem definido a existência de dois grupos de vírus da BIG. Um grupo consiste de amostras nefrotrópicas, as quais produzem lesões nos rins em adição a lesões no sistema respiratório (WINTERFIELD & HITCHNER, 1962; CUMMING, 1963; JULIAN & WILIS, 1969) e outro grupo de amostras que produzem sempre lesões no sistema respiratório sendo que, esporadicamente, podem lesar os rins (PURCELL & McFERRAN, 1972; JONES, 1974; MACDONALD & McMARTIN, 1976).

No Brasil, o isolamento do vírus da BIG, bem como evidências de participação do vírus no complexo das doenças respiratórias das galinhas, foi inexistente até 1956 (REIS & NOBREGA, 1956).

Em 1957, o vírus foi identificado no Brasil (HIPOLITO, 1957). Seguiram-se estudos de microscopia eletrônica e um limitado estudo sobre a prevalência de anticorpos anti-vírus da BIG em soros procedentes de Minas Gerais e alguns outros estados (HIPOLITO et alii, 1960/61; HIPOLITO & GODOY, 1963).

Em 1973, duas amostras de vírus da BIG foram isoladas em São Paulo de casos clínicos da chamada "síndrome nefrite-nefrose" (HIPOLITO et alii, 1973).

Recentemente, ficou constatado que a prevalência de anticorpos anti-vírus da BIG foi de 100% em algumas granjas estudadas em Minas Gerais. A alta frequência de anticorpos anti-vírus da BIG nessas granjas, ocorreu na ausência de sintomatologia clínica sugestiva da doença (HEREDIA et alii, 1978).

Outro estudo, realizado em São Paulo, confirmou a alta prevalência de anticorpos contra o vírus da BIG em diversas granjas daquele estado (HSIUNG et alii, 1978).

Aspectos clínicos e anátomo-patológicos da "síndrome nefrite-nefrose" foram descritos em 1979 (SILVA et alii, 1979).

Em 1980, foi iniciada a vacinação contra a BIG no Brasil, usando-se para tal uma amostra importada: "Holland" H-120 (BRASIL, 1980).

Como nenhum dos estudos realizados no Brasil abordou a patogênese e o problema da virulência das amostras isoladas e estudadas, a decisão de se vacinar aqui nesse país foi uma saída de emergência, mas com um completo desconhecimento de fatores básicos como potencial patogênico, características antigênicas e prevalência de variantes e sub-tipos sorológicos do vírus da BIG. Assim, é impossível avaliar-se se as metas de tal esforço tem sido alcançadas.

Estudos sobre a virulência das amostras de vírus da BIG isoladas no Brasil são importantes para se tentar prever o potencial dessas amostras em se estabelecerem, espalharem a outras aves e causarem doença por si sô.

Neste estudo, foram utilizadas aves gnotobióticas (GN) na avaliação da patogenicidade e seus determinantes, de duas amostras brasileiras do vírus da BIG (208 e 29-78). Existiu uma oportunidade única de se conhecer a natureza das lesões macro e microscópicas em ausência de outros agentes que poderiam influir na sua extensão, bem como localização. Houve chance de se observar a sintomatologia clínica, seu curso, intensidade, bem como o envolvimento sequencial de diferentes respostas e órgãos. Outras relações estudadas foram: susceptibilidade, resposta clínica e correlação entre órgão envolvido e sintomas clínicos. Sendo assim, alguns atributos biológicos de duas amostras brasileiras do vírus da BIG, foram estudados.

A caracterização da virulência das amostras é de particular interesse porque permite uma avaliação do papel dessas amostras no quadro das doenças respiratórias, renais e reprodutoras, livrando-se das correlações de achados em outros países.

O presente estudo teve como objetivo específico a análise do caráter e da progressão das lesões causadas pelas amostras 208 e 29-78 em aves GN e isentas de patógenos (SPF).

Outras características importantes foram consideradas:

- a - Habilidade em infectar e causar sintomatologia.
- b - Células específicas envolvidas e lesadas no processo de infecção.
- c - Localização das áreas de maior envolvimento que possivelmente influíram no desenvolvimento dos sintomas clínicos.
- d - Resposta de anticorpos (humoral).

REVISÃO DE LITERATURA

HOFSTAD (1945) estudou a patogênese de uma amostra do vírus da BIG em aves com 21 dias de idade, inoculadas pela via intratraqueal. A emergência dos sintomas clínicos de doença respiratória (espirros, dispnéia e ronqueira pulmonar) ocorreu a partir de 18 horas após inoculação (h.a.i.), permanecendo até 180 h.a.i.. O único achado macroscópico, encontrado nas aves sacrificadas e necropsiadas, foi uma traqueíte discreta com exsudato na luz traqueal. Histologicamente observou espessamento do epitélio traqueal, principalmente nas áreas de infiltração celular e hipertrofia dos centros linfóides germinativos na lâmina própria. Ocorreu edema discreto em algumas áreas da mucosa e submucosa. A camada celular superficial do epitélio traqueal ficou atípica a partir de 24 h.a.i., devido à ausência de células ciliadas colunares, células caliciformes e glândulas mucosas.

GARSIDE (1965) estudou as lesões microscópicas causadas pelo vírus da BIG nas traquéias de aves SPF com cinco semanas de idade, inoculadas pela via intratraqueal com uma dose vírica de $10^{6.0}$ DIE₅₀ (dose para infectar 50% dos embriões de galinha inoculados). Ocorreu intensa infiltração celular no epitélio traqueal, constituída de linfócitos, células plasmáticas e histiócitos, de 48 a 240 h.a.i.. A mucosa ficou muito espessada. As células caliciformes e glândulas mucosas desapareceram a partir de 48 h.a.i.. Os vasos e capilares sanguíneos ficaram proeminentes na mucosa espessada. O epitélio permaneceu intacto e desciliado em algumas

partes, sendo que as células da superfície mantiveram a sua estrutura colunar, a despeito da descamação e presença de células cubóides em outras partes.

COOK (1968) observou que, após inoculação do vírus da BIG (amostra inglesa, sorotipo Massachusetts) em aves com diferentes idades (dose vírica: $10^{6.0}$ DIE₅₀/via intratraqueal), 100% das aves apresentaram sintomas clínicos de doença respiratória (espirros, ronqueira pulmonar) a partir de 48 até 504 h.a.i.. O vírus foi isolado da traquéia e dos pulmões (24 a 720 h.a.i.), rins e tonsilas cecais (24 a 840 h.a.i.) e baço (24 a 120 h.a.i.).

CRINION et alii (1971b) estudaram as lesões nos ovidutos de pintos infectados com $10^{4.0}$ DIE₅₀ do vírus da BIG (amostra 33, sorotipo Massachusetts) pela via aerosol. Todos os pintos apresentaram distúrbios respiratórios (espirros e obstrução nasal) a partir de 36 h.a.i.. Cerca de 25% das aves morreram durante a fase aguda da doença respiratória (1.^a e 2.^a semana após inoculação). Até 40 dias após inoculação, nenhuma lesão macro ou microscópica foi encontrada nos ovidutos das aves que morreram ou foram sacrificadas. A partir de 44 dias após inoculação, foram encontradas lesões macroscópicas nos ovidutos (ovidutos císticos). Nesses ovidutos císticos, as lesões microscópicas foram caracterizadas por infiltração linfocitária difusa seguida de hipoplasia epitelial localizada e fibrose, com obstrução da luz desses órgãos. Os ovidutos císticos foram encontrados em 22% das aves examinadas. O vírus foi isolado da traquéia, pulmões, sacos aéreos, oviduto, ovário, rins e bursa de Fabricius.

PURCELL & McFERRAN (1972) estudaram a patogenicidade de uma amostra irlandesa do vírus da BIG (VF 70-733, sorotipo Massachusetts) para aves SPF com 12 semanas de idade, inoculadas com $10^{6.75}$ DIE₅₀ pela via aerosol. Todas as aves infectadas apresentaram distúrbios respiratórios (espirros, obstrução nasal, dispnéia) entre 48 e 312 h.a.i.. Lesões macroscópicas foram encontradas na traquéia, sacos aéreos e rins. No sistema respiratório, as lesões microscó-

picas foram encontradas na traquéia e brônquios. Na traquéia ocorreu descamação das células colunares ciliadas, células caliciformes e glândulas mucosas, a partir de 18 h.a.i., seguida de hiperplasia epitelial (48 h.a.i.) e infiltração difusa de células mononucleares (linfócitos) na lâmina própria (72 h.a.i.), além de hipertrofia dos centros linfóides germinativos. As lesões nos brônquios primários e secundários foram semelhantes às descritas para a traquéia. O vírus foi isolado da traquéia (24 a 288 h.a.i.), dos sacos aéreos (24 a 312 h.a.i.) e dos rins (24 a 336 h.a.i.).

CRINION & HOFSTAD (1972) estudaram a patogenicidade de quatro amostras do vírus da BIG para ovidutos de aves com idades diferentes (1, 8, 15, 22, 29 dias), infectadas com $10^{4.0}$ DIE₅₀ de cada amostra, pela via aerosol. As amostras variaram em sua habilidade de lesar o oviduto, independente da idade em que as aves foram expostas ao vírus. As amostras 5968 (sorotipo Connecticut) e Iowa 609 (sorotipo Iowa 609) não causaram lesões macro e microscópicas no oviduto, independente da idade das aves. As amostras 33 (sorotipo Massachusetts) e Austrália T (sorotipo Austrália T) lesaram os ovidutos das aves infectadas, principalmente nos grupos com um e oito dias de idade. Nessas aves, as amostras causaram lesões microscópicas nos ovidutos, mas somente a amostra 33 causou lesões macroscópicas (ovidutos císticos). Células infectadas com o vírus da BIG foram detectadas pela imunofluorescência direta no oviduto das aves infectadas com amostras 33 e Austrália T.

JONES & JORDAN (1972) inocularam pintos SPF (1 dia de idade) com vírus da BIG (amostra M-41, sorotipo Massachusetts) pela via conjuntival (ocular). Cada ave recebeu uma dose vírica de $10^{6.4}$ DIE₅₀/0,1 ml diluída 1:10. Todas as aves apresentaram sintomas clínicos de doença respiratória (espirros, respiração bucal) a partir de 48 até 408 h.a.i.. Uma ave morreu a 120 h.a.i. e três a 168 h.a.i.. À necropsia, foi encontrado um tampão caseoso rígido alojado na sinuária das aves que morreram. O vírus foi isolado de 24 a 336 h.a.i.

(sangue, cavidade nasal, traquéia, pulmões e rins) e de 24 a 264 h.a.i. (oviduto e ovário). Pela imunofluorescência direta, células infectadas com o vírus da BIG foram detectadas na traquéia e pulmões (24 a 168 h.a.i.), rins (24 a 264 h.a.i.) e não foram detectadas no oviduto e ovário.

SPRINGER et alii (1974) estudaram a patogênese de uma amostra atenuada do vírus da BIG (sorotipo Massachusetts) em aves gnotobióticas (GN) com cinco dias de idade, inoculadas pela via nasal (intranasal) com duas gotas de uma suspensão vírica contendo $10^{7.8}$ DIE₅₀/0,2 ml. Todas as aves apresentaram sintomas clínicos de doença respiratória (espirros e coriza com exsudato sero-mucoso) entre 72 e 168 h.a.i.. Nenhuma ave morreu. Após sacrifício, à necropsia, encontraram discreta aerosaculite (sacos aéreos torácicos posteriores) em todas as aves sacrificadas nas três primeiras semanas após inoculação. As lesões microscópicas encontradas na traquéia foram: hipertrofia epitelial sem descamação de células do epitélio superficial, seguida de infiltração de células mononucleares e heterófilos. Na lâmina própria dos brônquios e da traquéia, foram encontrados centros linfóides germinativos. As lesões microscópicas nos sacos aéreos foram: descamação epitelial, edema e infiltração de células mononucleares e heterófilos.

JONES (1974) estudou a patogênese da amostra "M-41" do vírus da BIG para aves SPF com 30 semanas de idade. Inoculou um grupo de aves (A) pela via intratraqueal, outro grupo (B) pela via endovenosa e um outro (C) pela via intra-oviduto. Distúrbios respiratórios (espirros, dispnéia, respiração bucal e ronqueira pulmonar), foram observados no grupo A (a partir de 48 h.a.i.), no grupo B (a partir de 72 h.a.i.) e no grupo C (a partir de 96 h.a.i.). As aves dos grupos B e C ficaram letárgicas e à necropsia foram encontradas lesões macroscópicas nos rins (hipertrofia e palidez), sendo que as carcaças dessas aves estavam desidratadas. Nos rins, as lesões microscópicas foram caracterizadas por acúmulo de uratos (cristais) intratubulares, acompanhados de necrose

do epitélio tubular (túbulos e ductos coletores da região medular). Não ocorreram lesões macro e microscópicas nos rins das aves do grupo A. O vírus foi isolado dos rins, traquéia e pulmões dos três grupos e células infectadas com o vírus da BIG foram detectadas no epitélio tubular dos rins das aves dos grupos B e C, pela imunofluorescência.

SILLER & CUMMING (1974) estudaram a patogênese de duas amostras do vírus da BIG nefrotrópicas (Amostra A, sorotipo Austrália A, pouco virulenta e Amostra T, sorotipo Austrália T, muito virulenta) para aves com quatro semanas de idade, inoculadas com uma dose vírica de $10^{6.5}$ DIE₅₀/0,1 ml (ambas amostras), diluída 1:100, pela via conjuntival. No grupo inoculado com a amostra A, ocorreu depressão na maioria das aves e morte em cinco aves. Depressão ocorreu entre 96 e 312 h.a.i. e morte entre 240 e 288 h.a.i.. No grupo inoculado com amostra T, depressão e morte ocorreram em 90% das aves entre 96 e 264 h.a.i.. Lesões macroscópicas nos rins (hipertrofia e palidez) foram encontradas, principalmente nas aves que morreram (ambas amostras). As lesões microscópicas nos rins foram semelhantes para ambas amostras. As lesões na medula renal foram mais extensas e graves do que na córtex. Foram caracterizadas por intensa infiltração de células plasmáticas (mono e polimorfonucleares) no interstício renal intertubular nas áreas afetadas precedida de degeneração e necrose das células epiteliais dos túbulos e dutos coletores. Focos de fibrose foram encontrados no interstício renal das aves recuperadas da infecção, a partir de 312 h.a.i., além da presença de muitos focos de tecido linfóide com ou sem centros linfóides germinativos.

POHL (1974) estudou a histopatogênese da síndrome nefrite-nefrose em aves com quatro semanas de idade, inoculadas com a amostra T pela via conjuntival. Cerca de 35% das aves inoculadas morreram, descontando as sacrificadas. As lesões microscópicas encontradas na traquéia e nos brônquios, entre 48 e 288 h.a.i., foram caracterizadas por descamação do epitélio ciliado, meta e hiperplasia epitelial, vacuoli-

zação e áreas de intensa destruição das camadas superficiais do epitélio, incluindo células caliciformes e glândulas mucosas. Entre 312 e 384 h.a.i., o epitélio recuperou sua aparência normal (pseudo-estratificado ciliado) e apenas algumas áreas de tecido linfóide, com ou sem centros linfóides germinativos, foram esporadicamente encontradas. Paralelamente, ocorreram lesões microscópicas nos rins, caracterizadas por degeneração e necrose das células do epitélio tubular, seguidas de intensa infiltração de células inflamatórias no interstício intertubular da medula e córtex renal, além da submucosa e lâmina própria dos dutos coletores principais e ureteres. Foram encontradas lesões no baço, bursa de Fabricius, timo, fígado e cérebro.

MACDONALD & McMARTIN (1976) compararam a patogenicidade da amostra vacinal "Holland" (sorotipo Massachusetts) em dois níveis diferentes de atenuação (H-52, menos atenuada e H-120, mais atenuada), para aves SPF com um dia e 12 semanas de idade. Foram utilizados dois grupos com a mesma idade e um grupo recebeu 0,05 ml de uma suspensão vírica contendo $0,5 \times 10^{4.1}$ DIE₅₀ (H-120) e o outro 0,05 ml de $0,5 \times 10^{3.7}$ DIE₅₀ (H-52), via intratraqueal. Os dois níveis de atenuação causaram distúrbios respiratórios (espirros, obstrução nasal com respiração bucal e ronqueira pulmonar) nas aves de ambas idades. Foram isolados de rins das aves infectadas (ambas idades), mas lesões macro e microscópicas só foram encontradas nos rins das aves infectadas com H-52 (ambas idades). As lesões microscópicas na traquéia, causadas pela H-52 e H-120, foram: descamação epitelial seguida de hiperplasia e infiltração linfocitária, observada somente nas aves com 12 semanas de idade. As lesões microscópicas causadas nos rins pela H-52 foram: degeneração do epitélio tubular, edema, heterofilia de medula e infiltração linfocitária. Lesões microscópicas na bursa de Fabricius (H-52 e H-120, ambas idades) foram caracterizadas por depressão linfocitária e degeneração cística do epitélio interno. Não ocorreu mortalidade nos grupos infectados com H-120 mas nos infectados

com H-52 chegou a 30% (aves com um dia de idade) e 10% (aves com 12 semanas). O vírus foi isolado da traquéia e pulmão (ambas idades, H-52 e H-120).

PURCELL et alii (1976) estudaram a patogênese da amostra "Austrália T" em aves com 12 semanas de idade, infectadas com $10^{5.0}$ DIE₅₀/50 ml via aerosol. Na traquéia, a partir de 24 h.a.i., as lesões microscópicas foram: descamação epitelial seguida de proliferação rápida das células basais residuais, originando uma cobertura epitelial indiferenciada e estratificada, com infiltração linfocitária a partir de 96 h.a.i.. As lesões pulmonares ficaram restritas aos brônquios primários e secundários, sendo semelhantes às encontradas na traquéia. Nos rins, as lesões microscópicas foram caracterizadas por necrose do epitélio tubular seguida de acúmulo intratubular de resíduos celulares e leucócitos polimorfonucleares na córtex e medula renal, além de infiltração linfocitária intensa e difusa nas áreas lesadas (interstício intertubular) com formação de centros linfóides germinativos no parênquima renal. O vírus foi isolado dos rins (48 a 192 h.a.i.) e dos sacos aéreos (120 a 240 h.a.i.).

GOUFFAUX et alii (1977) compararam as diversas doenças respiratórias das aves, com base na histologia da traquéia e pulmão. Estudaram quatro amostras do vírus da BIG (M-41, CONN-46; BI-6 e BI-10). Aves com cinco semanas de idade foram inoculadas pela via intratraqueal com 0,2 ml de uma suspensão vírica contendo $10^{5.0}$ DIE₅₀/0,2 ml de cada amostra. Observaram que todas as amostras de vírus da BIG estudadas causaram uma reação inflamatória aguda na traquéia e brônquios (24 a 264 h.a.i.), caracterizada por descamação da camada celular superficial do epitélio, seguida de hiperplasia epitelial e infiltração linfocitária discreta nas camadas mais profundas do epitélio. Grande número de centros linfóides germinativos foram encontrados na lâmina própria da traquéia e brônquios a partir de 216 h.a.i.. Anticorpos anti-vírus da BIG foram detectados a partir de 336 h.a.i..

ALEXANDER et alii (1978) estudaram a patogenicida

de de três amostras do vírus da BIG (Austrália T, H-52 e H-120) em aves com três semanas de idade inoculadas pelas vias oral e endovenosa. Diferentes doses víricas e vias de inoculação foram usadas para cada amostra de vírus. A mortalidade nos três grupos entre 26 e 35 semanas de idade chegou a 28% e a amostra Austrália T foi responsável por 55% dessas mortes. Todas as aves que morreram apresentaram lesões macroscópicas nos rins, caracterizadas por hipertrofia e acúmulo de uratos no parênquima renal e nos ureteres. Histologicamente, foi encontrada uma nefrite intersticial, dilatação tubular e fibrose, após destruição epitelial, devido ao acúmulo de resíduos celulares e cristais de uratos. O vírus foi isolado de fezes de todos os grupos infectados com as três amostras por mais de 227 dias após inoculação e das tonsilas cecais até 225 dias após inoculação (Austrália T), até 148 dias após inoculação (H-52) e até 161 dias (H-120).

MACDONALD et alii (1980) estudaram as lesões renais em grupos de aves SPF com três e dez semanas de idade, inoculadas com amostra H-52 pela via endovenosa com diversas diluições da suspensão vírica. Os rins das aves com três semanas de idade foram menos afetados do que os das aves com dez semanas. Doses mínimas ($0,05 \text{ ml de } 10^{7.3} \text{ DIE}_{50} / \text{ml diluída } 10^{-7}$) causaram lesões macro e microscópicas nos rins. O vírus foi isolado dos rins com essas lesões.

MACDONALD et alii (1980) concluíram que a amostra vacinal H-120 não lesa os rins de aves vacinadas pelas vias convencionais (nasal, oral e aerosol), conferindo ainda uma boa imunidade ativa contra as lesões macro e microscópicas causadas nos rins pela amostra H-52, em aves desafiadas com essa amostra pela via endovenosa. A imunidade ativa protegeu os rins mas não o sistema respiratório dessas aves.

CHONG & APOSTOLOV (1982) estudaram a patogênese da nefrite em aves SPF com um e quinze dias de idade, inoculadas com duas amostras diferentes do vírus da BIG (Austrália T e M-41), pelas vias conjuntival e nasal, com uma dose vírica de $10^{6.0} \text{ DIE}_{50} / 0,2 \text{ ml/ambas amostras}$. As duas amostras

causaram distúrbios respiratórios (espirros, obstrução nasal, respiração bucal e ronqueira pulmonar) nas aves infectadas, independente da idade. Esses sintomas clínicos foram observados em 80% das aves inoculadas com amostra M-41 e em 30% das aves inoculadas com Australia T. Cerca de 50% das aves infectadas com amostra Australia T morreram devido a uma nefrite aguda (ambas idades). Nessas aves que morreram, à histologia, foram encontrados focos de infiltração de células mono e polimorfonucleares na medula e córtex renal. Pela imunofluorescência direta, células infectadas com o vírus da BIG foram detectadas no epitélio de todos os segmentos dos túbulos e dutos coletores renais e no epitélio traqueal. Anticorpos anti-vírus da BIG foram detectados durante 30 semanas após inoculação. A amostra Australia T desenvolveu uma nefrite crônica nas aves que sobreviveram, caracterizada por lesões macro e microscópicas discretas, mas com a presença do vírus comprovada pela imunofluorescência, isolamento viral e microscopia eletrônica. O vírus foi detectado, pelos métodos acima descritos, por mais de 30 semanas após inoculação, independente da presença de anticorpos circulantes.

Esses estudos colaboraram para uma melhor compreensão e avaliação da importância das amostras estudadas, naqueles países de origem, servindo ainda de base técnica e comparativa no presente estudo.

MATERIAIS E MÉTODOS



1 - AVES UTILIZADAS:

1.1 - AVES GNOTOBIÓTICAS (GN):

Foram produzidas e mantidas de acordo com BRADLEY et alii (1967) e PLEASANTS (1977).

1.1.1 - Produção de Aves GN:

A - Ovos utilizados:

Ovos férteis e isentos de patógenos* (SPF), foram utilizados na obtenção de aves GN. Antes de incubação, foram vistoriados e lavados em solução aquosa de detergente neutro** 5% (temperatura ambiente) e colocados em incubadeira*** apropriada por 19 dias consecutivos. Ovoscopia foi feita semanalmente.

* Spafas-Rezende, Granja Rezende, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil.

** Extran MA-O₂, Merck, art. 7553, Rio de Janeiro, Brasil.

*** Petersyme, Suely Industrial S.A., Urussanga, Santa Catarina, Brasil.

B - Esterilização da casca dos ovos:

Ovos embrionados com 19 dias de incubação foram lavados em solução aquosa de detergente neutro* 5% (37°C) e introduzidos em uma solução de ácido peracético 2% (FIESER & FIESER, 1967) com 0,1% de detergente** (temperatura ambiente) durante 15 segundos. Em seguida, foram introduzidos em uma passagem (poço germicida) na parede do isolador maternidade, cheia de álcool iodado (solução 2%/37°C) e rapidamente transferidos para dentro do isolador (30 a 60 ovos de cada vez).

O isolador maternidade foi construído e equipado da seguinte forma: paredes laterais e fundo de compensado (20 mm espessura) revestidos com pintura resistente; teto de plástico flexível transparente (1 mm espessura); porto para entrada e saída de material (30 cm diâmetro x 30 cm comprimento) feito com tubo de PVC rígido, adaptado à parede do isolador e fechado por dentro e por fora com acessórios plásticos***; par de luvas de borracha*** longas, flexíveis e resistentes, adaptadas à parede frontal ao porto e usadas para manuseio interno do isolador; termostato para manutenção da temperatura interna a 37°C; sistema de ventilação*** com ante com filtros esterilizantes*** de ar (entrada e saída); poço germicida de PVC rígido (100 mm Ø) em forma de "U" cheio de álcool iodado 2% (porta de entrada dos ovos); dimensões internas de ± 1 metro cúbico.

Durante utilização, o isolador maternidade foi equipado com frascos de vidro****, próprios desse sistema, com

* Extran MA-O₂, Merck, art. 7553, Rio de Janeiro, Brasil.

** Sodium alkylarylsulfonate, Fisher, S-198, USA.

*** GF Supply Division, Standard Safety Equipment Company, 431, North Quentin Road, Palatine, Illinois, USA.

**** Pyrex-American Square - Pak Flask, American Sterilizer Company, Erie, Pennsylvania, USA.

água destilada, gaze, pinças e tubos de ensaio 13 x 100 mm com tampa e "swabs", esterilizados em autoclave (121°C/30 minutos).

O isolador maternidade e seus componentes, foi esterilizado internamente com solução aquosa de ácido peracético 2% com detergente (0,1%)* vaporizada sobre pressão (SPRAY), quatro a cinco dias antes da entrada dos ovos. Dois dias após esterilização química, o sistema de ventilação foi ligado para retirar os vapores de ácido peracético (irritante de mucosas).

C - Eclosão

Os ovos introduzidos no isolador maternidade ficaram deitados no fundo, em cima de gaze ligeiramente umedecida. Dois a três dias após a entrada dos ovos no isolador, os pintos GN nasceram. A mortalidade dos embriões foi alta (50%), possivelmente devido ao tratamento químico da casca (esterilização).

Após o nascimento, os pintos GN ficaram no isolador maternidade por mais dois dias sem comer e com água à vontade, para acelerar a absorção do saco da gema.

1.1.2 - Manutenção das Aves GN:

No terceiro dia após o nascimento, os pintos foram transferidos para os isoladores de manutenção em um cilindro de transporte (estéril), próprio desse sistema, adaptável aos portos dos isoladores (maternidade e manutenção).

Os isoladores de manutenção foram construídos, equipados e esterilizados da mesma maneira que o isolador mater

* Mesma solução empregada na esterilização da casca dos ovos.

nidade. As dimensões do isolador de manutenção foram: 60 cm altura x 60 cm largura x 1,50 m comprimento.

Cada isolador recebeu dez pintos GN. Um único tipo de alimento foi oferecido desde a entrada dos pintos até o fim do experimento. Ração comercial*, enriquecida com vitaminas foi utilizada. Para cada quilo de ração comercial seca, foram adicionados: 10 ml de uma solução de vitaminas lipossolúveis** e 2 g de uma mistura de vitaminas hidrossolúveis***. A ração continha vitaminas em doses dez vezes maiores do que as requeridas pelas aves (FORBES & PARK, 1959) para compensar a destruição pelo calor. Feita a mistura ração mais vitaminas, dentro de frascos apropriados****, adicionou-se água destilada fervente na proporção de duas medidas de água para uma de ração. Após uma boa homogeneização, a ração foi esterilizada em autoclave comum (121°C/45 minutos). Em seguida, foram introduzidos nos isoladores, passando primeiro por uma esterilização química comum ao sistema. A água foi fornecida às aves junto com a ração.

As aves foram alimentadas duas vezes por dia (manhã e tarde), de forma a proporcionar sempre sobra de comida. Os isoladores foram mantidos aquecidos (37°C) durante os vinte primeiros dias de permanência das aves. A luminosidade interna dos isoladores foi natural, através da luz solar indireta (janelas).

Após infecção das aves, todo material retirado dos

* Ração para pintos destinados à produção de carne, marca Cargill Agrícola S.A, Santa Luzia, Minas Gerais, Brasil.

** Composição da solução de vitaminas lipossolúveis: Acetato de vit A, 210 mg; Calciferol, 7,5 mg; α -tocoferol, 37.500 mg; Menadiol, 2.500 mg; óleo de milho q.s.p. 500 g.

*** Composição da mistura de vitaminas hidrossolúveis: Tiamina HCl, 2.180 mg; Riboflavina, 270 mg; Piridoxina HCl, 720 mg; Cobalamina, 10 mg; Ácido fólico, 400 mg; Colina, 46.200 mg; Pantotenato de cálcio, 3.090 mg; Inositol, 20.000 mg; Amido q.s.p. 200 g.

**** Pyrex - American Square - Pak Flask, American Sterilizer Company, Erie, Pennsylvania, USA.

isoladores foi autoclavado (121°C) 15 minutos) antes de ser descartado ou lavado e reutilizado.

1.1.3 - Prova de Esterilidade dos Isoladores e Aves GN:

A vigilância das aves GN, quanto à esterilidade, foi feita a partir de "swabs" retais colhidos de seis aves por isolador, semanalmente, e depositados em caldo tioglicolato* durante uma semana a 37°C.

Outros artifícios foram usados na vigilância da esterilidade dos isoladores: observação dos restos de comida e fezes (presença de fungos) e prova do cheiro do ar que sai do isolador (fermentação).

1.2 - AVES ISENTAS DE PATÓGENOS (SPF)

1.2.1 - Produção de Aves SPF:

A - Ovos utilizados:

Tanto a qualidade como a procedência e tratamento dos ovos, foram idênticas aos ovos utilizados na produção de aves GN.

B - Esterilização da casca dos ovos:

Foi idêntica à metodologia empregada nos ovos destinados a produção de aves GN, mas sem o tratamento com solução de ácido peracético 2%. A desinfecção final da casca

* Bacto - Thioglycollate Medium, 0363-01, Difco, Detroit, Michigan, USA.

foi feita com solução de álcool iodado 2% (37°C), rapidamente, e em seguida, os ovos foram colocados em estufa bacteriológica (37°C) até a eclosão dos ovos (2-3 dias depois).

Uma semana antes da entrada dos ovos, a estufa bacteriológica foi desinfetada com fumigação*. A estufa foi equipada com ventilador e recipientes cheios de água para proporcionarem uma umidade ambiental alta (85%).

Os ovos foram colocados deitados no fundo da estufa (piso de cimento áspero) e começaram a nascer com 21 dias de incubação. A interferência da desinfecção da casca desses ovos na taxa de eclodibilidade foi mínima (5%).

1.2.2 - Manutenção das Aves SPF:

Após nascimento, os pintos SPF foram transferidos para três salas separadas, localizadas em andares diferentes e colocados em gaiolas previamente esterilizadas em forno durante duas horas a 180°C.

Cada gaiola foi equipada com uma fonte de calor (lâmpada de 60 watts), ligada ininterruptamente durante os 15 primeiros dias de permanência das aves. As dimensões de cada gaiola foram: 80 cm largura x 80 cm comprimento x 50 cm altura.

As aves SPF foram alimentadas com ração comercial** farelada não esterilizada, não enriquecida com vitaminas, desde o segundo dia de idade até o fim do experimento.

Cada sala utilizada para criação das aves SPF foi equipada com um saco de ração, três gaiolas (exceto sala con

* Fumigação: 60 ml de formaldeído comercial + 35 g de $KMnO_4$ + 20 ml de água destilada/metro cúbico.

** Ração para pintos destinados à produção de carne, marca Cargill Agrícola S.A., Santa Luzia, Minas Gerais, Brasil.

troles SPF - só uma gaiola), um litro de álcool iodado 2%, um avental e cada gaiola foi equipada com dois comedouros e um bebedouro grande, esterilizados em autoclave (121°C/30 minutos).

Todas as salas foram equipadas com exaustor com tela e filtro de gaze e as janelas, portas e ralos foram totalmente calafetados para impedir entrada de insetos.

Essas salas, anteriormente, nunca foram usadas para infecção experimental de aves ou qualquer outro animal.

O acesso a essas salas, para limpeza e manutenção das aves SPF, ficou por conta de uma única pessoa.

A luminosidade ambiental foi direta (24 horas por dia) durante os 15 primeiros dias, por causa do sistema de aquecimento a base de lâmpada. A partir daí, ficaram somente com a luminosidade diurna (solar).

Água e ração foram fornecidas com fartura e renovadas diariamente até o fim do experimento.

Após infecção das aves, fezes, restos de comida e água, foram acondicionados em latas e autoclavados (121°C/15 minutos) antes do descarte.

2 - AMOSTRAS DE VÍRUS DA BIG ESTUDADAS:

2.1 - AMOSTRA 208:

A amostra 208 (sorotipo Connecticut) foi isolada a partir de "swabs" traqueais de aves comerciais adultas (poedeiras) com distúrbios respiratórios (espirros, dispnêia, ronqueira), após três passagens consecutivas em ovos embrionados de galinha (O.E.G.) com 10 dias de incubação, via cavidade alantóide, em setembro de 1973, pelo Dr. Maurício Resende, no Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Esta amostra foi mantida liofilizada (-20°C). O vírus foi reconstituído com 1 ml de PBS (Phosphate Buffered Saline)

pH 7.2 (estéril), diluído a 10^{-1} (1:10) com PBS pH 7.2 estéril e inoculado na cavidade alantóide de 10 O.E.G. (0,2 ml/ovo) com dez dias de incubação, após prova de esterilidade em caldo BHI* e tioglicolato**, incubados a 37°C/72 horas. Decorridas 76 horas após inoculação, oito ovos foram colocados na geladeira (+4°C) durante 16 horas para morte dos embriões. O líquido alantóide foi colhido assepticamente com seringa estéril, agrupado e centrifugado a 6.000 r.p.m. em centrífuga refrigerada*** (+4°C) para clarificação, durante 30 minutos. O sobrenadante foi colhido e recebeu 1 ml de uma solução de antibióticos**** (200x200) para cada 30 ml de líquido alantóide clarificado. Após uma boa homogeneização, a mistura foi colocada à temperatura ambiente para antibiótico agir (20 minutos). Em seguida, foi feita prova de esterilidade (igual à descrita anteriormente). O líquido alantóide contendo vírus foi dividido em alíquotas de 5 ml, estocado a -70°C e chamado de "vírus estoque-semente". Dois ovos foram inoculados para controle do vírus, sendo abertos 216 horas após inoculação. A presença do vírus foi comprovada através das lesões típicas do vírus da BIG nos embriões: nanismo, enrolamento, presença de uratos nos mesonefros e hemorragia hepática. Nenhuma atividade hemaglutinante***** foi detectada no líquido alantóide dos ovos abertos com 96 e 216

* Bacto-Brain Heart Infusion, 0132-01, Difco, Detroit, Michigan, USA.

** Bacto-Thioglycollate Medium, 0363-01, Difco, Detroit, Michigan, USA.

*** GSA rotor, Sorvall Super Speed, RC 2-B, Automatic Refrigerated Centrifuge, Newton, Connecticut, USA.

**** Solução de antibióticos 200x200: 1.000.000 u.i. penicilina g potássica (Fontoura-Wyeth) + 1 g de sulfato de estreptomicina (Fontoura-Wyeth) + 5 ml de PBS pH 7.2, filtrados em swinnex 25 mm com membrana filtrante GSWP - 02500, 0,22 um, Millipore, Bedford, Massachusetts, USA.

***** Prova de hemaglutinação para o vírus de Newcastle (CUNNINGHAM, 1973).

horas após inoculação. Uma outra passagem em O.E.G. (dez dias de incubação), foi realizada a partir do "vírus estoque-semente" e o líquido alantóide colhido foi chamado de "vírus de trabalho". O processo de inoculação, colheita e preparo, foi idêntico ao usado para o "vírus estoque-semente". Também ficou estocado a -70°C e foi o vírus usado neste estudo.

2.2 - AMOSTRA 29-78:

A amostra 29-78 (sorotipo indeterminado) foi isolada a partir de inóculo preparado com fragmentos de traquéia e pulmão de frangos de corte com sintomas clínicos de doença respiratória (espirros, ronqueira pulmonar), após quatro passagens consecutivas em O.E.G. com 10 dias de incubação, via cavidade alantóide, em maio de 1978, pelo Dr. Regino Leonardo de Oliveira, no Laboratório de Doenças das Aves do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais. Foi mantida congelada a -70°C . O "vírus estoque-semente" e o "vírus de trabalho" dessa amostra, foram obtidos da mesma forma que a amostra 208.

2.3 - CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS:

As amostras 208 e 29-78 foram caracterizadas como sendo vírus da BIG (MATTHEWS, 1982) com base nas seguintes provas: comportamento em O.E.G. (BEAUDETTE & HUDSON, 1937; LOOMIS et alii, 1950); soroneutralização (PAGE & CUNNINGHAM, 1962); aglutinação de eritrócitos de galinha (CUNNINGHAM, 1973) e imunodifusão (PARISIS, 1965; SINGH & MALIK, 1974; SLEMONS*).

* SLEMONS, R. Comunicação pessoal. Preparation of type specific (RNP) influenza antigen. Department of Veterinary Science. University of Wisconsin. Madison, Wisconsin, USA.

A amostra "Holland" H-120 (sorotipo Massachusetts) (WINTERFIELD et alii, 1975) foi usada como vírus de referência neste estudo, inclusive como controle nas provas empregadas na caracterização das amostras.

3 - PLANO DE UTILIZAÇÃO DAS AVES

3.1 - NÚMERO DE AVES UTILIZADAS:

Foram utilizadas 30 aves GN e SPF por amostra de vírus estudada e oito aves GN e SPF como controles de ambas amostras.

Cada amostra foi estudada separadamente. Foram utilizados três isoladores com dez aves cada e três gaiolas com dez aves cada, por amostra estudada. Foi utilizado um isolador (oito aves GN) e uma gaiola (oito aves SPF) como controles de ambas amostras.

No total, 68 aves GN e SPF foram utilizados no presente estudo.

3.2 - IDADE DAS AVES:

Tanto as aves GN como SPF foram infectadas aos 21 dias de idade.

3.3 - PLANO DE SACRIFÍCIO:

Para cada amostra, duas aves GN e SPF foram sacrificadas nos dias 1,2,3,4,5,6,7,8,9,11,13,15 e uma ave nos dias 18,21,25,30 após inoculação. Duas aves de cada grupo (GN e SPF/amostra) foram sacrificadas dois dias antes da inoculação, para obtenção de soro destinado à pesquisa de anticorpos (passivos ou ativos) anti-vírus da BIG (controles do

grupo). Duas aves controles (GN e SPF) foram sacrificadas com 24, 31, 38 e 45 dias de idade, correspondendo a cada semana de experimento.

4 - INOCULAÇÃO DAS AVES

4.1 - TITULAÇÃO DAS AMOSTRAS DE VÍRUS:

Foi feita em O.E.G. com dez dias de incubação. Diluições seriadas do vírus de trabalho (10^{-1} a 10^{-8}) foram utilizadas (cinco O.E.G./diluição) e o título vírico foi a recíproca da mais alta diluição em que o vírus causou lesão nos embriões (CUNNINGHAM & STUART, 1947). Os cálculos foram feitos de acordo com o método de REED & MUNCHEN (1938). O título do vírus é expresso em dose para infectar 50% dos embriões (DIE_{50}). O título do vírus de trabalho foi de $10^{3.8} DIE_{50}/0,2$ ml/amostra 208 e $10^{4.0} DIE_{50}/0,2$ ml/amostra 29-78.

4.2 - INOCULAÇÃO EXPERIMENTAL:

Os grupos de aves GN e SPF estavam livres de anticorpos precipitantes anti-vírus da BIG (passivos ou ativos) antes da exposição vírica, com base na pesquisa sorológica efetuada nas aves controles do grupo, sacrificadas dois dias antes da inoculação experimental.

Cada ave GN ou SPF (exceto controles) recebeu um total de 2,0 ml do vírus de trabalho, não diluído, assim distribuído: 0,25 ml em cada olho (via conjuntival-ocular), 0,5 ml em cada orifício nasal (intranasal) e 0,5 ml via oral. Assim, as aves receberam $10 \times (10^{3.8} DIE_{50}/0,2$ ml) ou $10^{4.8} DIE_{50}/2$ ml da amostra 208 e/ou $10 \times (10^{4.0} DIE_{50}/0,2$ ml) ou $10^{5.0} DIE_{50}/2$ ml da amostra 29-78.



5 - SACRIFÍCIO DAS AVES E COLETA DE MATERIAL

5.1 - SANGRIA:

Todas as aves GN e SPF, infectadas ou controles, foram sangradas pela via intracardíaca com seringa de 10 ml e agulha 30x10 (estéreis), antes do sacrifício. As amostras de sangue foram depositadas em tubos de ensaio com tampa de rosca (13x100 mm) estéreis, colocados à temperatura ambiente para coagular (30 minutos) e centrifugados a 3.000 r.p.m./15 minutos. O soro foi estocado a -20°C .

5.2 - SACRIFÍCIO E NECROPSIA:

As aves foram retiradas do isolador ou gaiola, inroduzidas dentro de sacos plásticos e rapidamente transportadas para uma capela estéril. Foram examinadas clinicamente, sangradas e sacrificadas através da injeção de ar via intracardíaca. Imediatamente foram necropsiadas e todos os achados e lesões macroscópicas foram anotados.

5.3 - COLETA DE AMOSTRAS:

Nove diferentes órgãos e tecidos (traquéia, pulmões, rins, baço, bursa de Fabrício, glândulas de Harder, tonsilas cecais, testículos, ovário, sacos aéreos torácicos posteriores e abdominais) foram removidos durante a necropsia e introduzidos em dois frascos (becker) contendo PBS pH 7.2 (banho de gelo), para retirar o excesso de sangue. Um frasco recebeu órgãos e tecidos destinados à imunofluorescência e o outro, à histologia. A metade cranial dos órgãos simples (traquéia, baço, bursa de Fabrício e ovário) e duplos (pulmões, rins, tonsilas cecais, glândulas de Harder, testículos e sacos aéreos) foram destinados à imunofluorescência e

a parte caudal, à histologia. As partes destinadas à imuno-fluorescência foram reduzidas e incluídas em Tissue-Tek* dentro de tubos plásticos e congelada a -20°C . As partes destinadas à histologia foram colocadas em frascos com formalina tamponada pH 7.0 (temperatura ambiente/1 semana/escuro).

Restos de carcaça e órgãos, foram colocados em latas apropriadas e esterilizadas em autoclave ($121^{\circ}\text{C}/30$ minutos) antes do descarte.

6 - PREPARO DOS SOROS IMUNES

6.1 - SOROS IMUNES ESPECÍFICOS ANTI-208, ANTI-29-78 e ANTI-H-120:

Foram produzidos separadamente, em três grupos de aves SPF com 10 semanas de idade, antes do início do experimento. Na primeira inoculação, cada ave recebeu 0,5 ml da suspensão vírica em cada narina, 0,25 ml em cada olho, 1,0 ml via oral e 2,0 ml via endovenosa (veia da asa). As aves receberam $10^{5.5}$ DIE₅₀/0,2 ml - amostra 208, $10^{6.2}$ DIE₅₀/0,2 ml - amostra 29-78 e $10^{7.6}$ DIE₅₀/0,2 ml - amostra H-120. Vinte e um dias após a primeira inoculação, as aves receberam uma segunda dose reforço, sendo 0,2 ml em cada narina e 0,2 ml via endovenosa da suspensão vírica não diluída. Decorridas duas semanas, as aves foram sangradas na veia da asa e testadas quanto à presença de anticorpos precipitantes anti-vírus da BIG. As aves fortemente positivas foram sangradas pela via intracardíaca e os soros foram retestados e estocados a -20°C , para serem usados como controles positivos nas provas de imunodifusão e imunofluorescência indireta.

* Tissue - Tek II O.C.T., Lab. Tek Products, Napperville, Illinois, USA.

6.2 - SORO IMUNE ANTI-GAMAGLOBULINA DE AVES:

A - Purificação da Gamaglobulina de Aves:

A partir de um "pool" de soros de aves adultas comunis e SPF, centrifugado a 3.000 r.p.m./15 minutos, foi preparada a gamaglobulina purificada, através da técnica de precipitação da gamaglobulina de aves com sulfato de amônia (CHERRY, 1974; HERBERT, 1974a). A solução final de gamaglobulina concentrada foi distribuída em pequenas alíquotas (0,5 ml) e estocada a -20°C .

B - Imunização de Coelhos:

A concentração final de proteína da solução concentrada de gamaglobulina de aves foi determinada* e ajustada para 1,0 mg/ml com PBS pH 7.2. Foram misturadas iguais partes de solução de gamaglobulina de aves (1,0 mg proteí-na/ml) e adjuvante completo de Freund**, conforme HERBERT (1974b). Imediatamente, seis coelhos adultos (1,8 - 2,0 Kg peso) foram inoculados com 0,1 ml dessa emulsão em cada dedo das patas dianteiras e traseiras e 0,2 ml em seis pontos diferentes do dorso lombar, via subcutânea. Vinte e um dias depois, foi feita nova inoculação. Solução de gamaglobulina de aves, sem adjuvante completo de Freund, ajustada para 200 nanômetros de absorvância* com PBS pH 7.2, foi inoculada (0,1 ml) em dois dedos de cada pata e em seis pontos diferentes do dorso de cada animal, via subcutânea. Duas semanas após segunda inoculação, foi retirada uma amostra de sangue (2 ml) da veia marginal da orelha de cada coelho e obtido soro, no qual se pesquisou anticorpos anti-gamaglobulina de aves pe-

* Spectofotometer Beckman, model 25, Palo Alto, California, USA.

** Difco, 0639-59, Detroit, Michigan, USA.

la imunodifusão. Os animais fortemente positivos foram sangrados totalmente (veia jugular) e o soro foi estocado a -20°C .

7 - IMUNODIFUSÃO

Todas as amostras de soro das aves GN e SPF, infectadas ou controles, foram testadas quanto à presença de anticorpos precipitantes específicos, diretamente contra antígeno homólogo, preparado a partir de membrana cório-alantóide (MCA) de O.E.G. (13 dias de incubação) infectadas com amostra homóloga de vírus da BIG, pela técnica de imunodifusão em ágar.

Com algumas modificações descritas abaixo, os antígenos foram preparados com base em técnicas estabelecidas (PARISIS, 1965; SINGH & MALIK, 1974; SLEMONS*). Entre 30 e 50 O.E.G. com 13 dias de incubação foram utilizados no preparo do antígeno específico de cada amostra de vírus (H-120, 208 e 29-78). Cada O.E.G. foi inoculado com 0,25 ml de uma suspensão vírica (Título $> 10^{5.0}$ DIE₅₀/0,2 ml), não diluída, via cavidade alantóide. A amostra H-120, altamente adaptada a O.E.G., foi inoculada e as MCA dos ovos foram colhidas 24 horas após inoculação (h.a.i.). Com as amostras 208 e 29-78, pouco adaptadas a OEG, metade das MCA foram colhidas 24 h.a.i. e o restante com 48 h.a.i.. Para colheita das MCA, os ovos foram colocados na geladeira ($+4^{\circ}\text{C}$ /16 horas) para morte dos embriões. Todas as MCA foram retiradas assepticamente, lavadas em PBS pH 7.2 estéril (banho de gelo), enroladas em hastes de madeira (estéreis), desidratadas ao ar (20 minutos), agrupadas e estocadas a -70°C . Cada grupo específico foi preparado separadamente. As MCA foram desconge

* SLEMONS, R.. Comunicação pessoal. Preparation of type specific (RNP) influenza antigen. Department of Veterinary Science. University of Wisconsin, Madison, Wisconsin, USA.

ladas, trituradas*, congeladas e descongeladas (-20°C) por três vezes consecutivas, sonicadas** em cinco ciclos consecutivos de 30 segundos cada (potência e amplitude máxima). A massa final foi centrifugada*** a 10.000 r.p.m. durante 30 minutos ($+4^{\circ}\text{C}$). O sobrenadante foi colhido e separado em pequenas alíquotas (0,5 ml). Cada alíquota recebeu uma gota de uma solução de NaN_3 1:10.000, preparada com PBS pH 7.2. Foram estocadas a -70°C . Uma amostra desse antígeno foi testada, pela imunodifusão, frente a soros específicos imunes anti-208, 29-78, H-120 e vírus de Newcastle, além de soros de aves controles (não imunes).

8 - HISTOLOGIA

Fragmentos de nove órgãos e tecidos (rins, baço, traquéia, pulmões, bursa de Fabricius, tonsilas cecais, glândulas de Harder, sacos aéreos torácicos posteriores e abdominais, testículos e ovário) foram colhidos, fixados em formalina tamponada pH 7.0, reduzidos, desidratados, clarificados (diafanizados) e incluídos em parafina****. Dois cortes de quatro diferentes partes dos tecidos e órgãos foram confeccionados***** com $5\ \mu$ de espessura e rotineiramente corados pelo método de hematoxilina e eosina (H&E) (SANDERS, 1977).

A histologia comparada e diferencial, entre órgãos

* Cell-Grinder, Potter-Elvehjem, A-29.461, Arthur H. Thomas Company, Philadelphia, Pennsylvania, USA.

** Aparelho de ultra-som MSE (sem dados técnicos).

*** Rotor SS-34, Super Speed Sorvall, RC2-B, Newton, Connecticut, USA.

**** Autothechnican model 2A, Thechnican Tissue Processor, The Thechnican Company, Chauncey, New York, USA.

***** Microtome Spencer, model 820, American Optical Company (Instrument Divison), Buffalo, New York, USA.

e tecidos das aves GN e SPF infectadas e controles, foi realizada com base em vários trabalhos (LUCAS & JAMROZ, 1961; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1971; PAYNE, 1971; HODGES, 1974).

9 - ACHADOS E SINTOMAS CLÍNICOS

Antes e após inoculação vírica, todas as aves infectadas ou controles (GN e SPF), foram diariamente observadas e analisadas, o que variou desde o consumo de alimentos até o comportamento das aves. Achados e sintomas clínicos, possíveis de serem observados em aves (espirros, dispnéia, sinusite, respiração bucal devido obstrução nasal, edema facial, coriza, ronqueira pulmonar, cianose da crista e barbeta, sonolência ou letargia, tristeza, prostração, anorexia, diminuição do crescimento, diarréia, incoordenação motora, distúrbios nervosos e temperatura retal) foram pesquisados e anotados quando presentes. A medição da temperatura retal foi feita com termômetro clínico comum (FREEMAN, 1971).

10 - PREPARO DO ANTICORPO FLUORESCENTE (CONJUGADO)

Soros de coelhos (anti-gamaglobulina de aves) foram agrupados, centrifugados para clarificação (3.000 r.p.m./15 minutos) e precipitados lentamente, por três vezes consecutivas, com sulfato de amônia (35% da saturação final) em banho de gelo (CHERRY, 1974; HERBERT, 1974a). O pH final da solução saturada de sulfato de amônia foi ajustado para 7,0 após dissolução de Na_2HPO_4 anidro nessa solução à temperatura ambiente e o pH foi medido em uma diluição da solução final a 1:40 em água destilada (TALEPOROS & ORNSTEIN, 1976). O precipitado final foi dissolvido em solução 0,05 M de tampão fosfato* pH 7.2 e exaustivamente dialisado contra a mesma solução tampão a 4°C.

* Bacto-Fa Buffer, 2314-15, Difco, Detroit, Michigan, USA.

A concentração de proteína da solução final foi de terminada a 280 nm* e ajustada para 10 mg proteína/ml com so lução 0,5 M de NaCl. Na solução contendo 10 mg proteína / ml foi adicionado isotiocianato de fluoresceína** (I.T.C.F.), na proporção de 10 microgramas (μ g) de I.T.C.F. por miligra ma de proteína da solução. O processo de conjugação foi fei to de acordo com CHERRY (1974). Globulinas pobremente marca das, não marcadas e outras globulinas indesejáveis foram re movidas por trocas iônicas em coluna de cromatografia con tendo DEAE (dietilaminoetil)*** celulose ativada (McDEVITT et alii, 1963). Várias frações foram coletadas e as que não apresentaram inespecificidade, foram selecionadas para uso, dialisadas em solução 0,05 M de tampão fosfato pH 7.2 por 24 horas, após concentração em solução saturada de PEG- 20.000****. Tudo foi realizado a 4°C, no escuro e o conjuga do final foi ampulado (0,5 ml/ampola) e estocado a -20°C.

11 - IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA

Fragmentos de nove órgãos e tecidos (rins, baço, traquéia, pulmões, bursa de Fabricius, tonsilas cecais, glân dulas de Harder, sacos aéreos torácicos posteriores e abdo minais, testículos e ovário) das aves GN e SPF, infectadas e controles, imersos em Tissue-Tek*****, foram retiradas dos tubos plásticos de moldagem, montados em suporte de metal e processados em micrótomo de congelação*****. Foram confec-

* Spectofotometer Beckman, model 25, Palo Alto, California, USA.

** I.T.C.F., Isomer I, BBL, 12008, Baltimore, Maryland, USA.

*** DEAE - celulose, Sigma, D-8382, St. Louis, Missouri, USA.

**** Polyethylene glycol-20.000, -2263, Sigma, St. Louis, Missouri, USA.

***** Tissue-Tek II O.C.T., Lab. Tek Products, Napperville, Illinois, USA.

***** Cryostat, Damon - International Equipment Company, Needham Heights, Massachusetts, USA.

ccionados dois cortes de quatro diferentes partes de cada órgão e tecido, com 5 μ de espessura, os quais foram transferidos para uma lâmina fina (0,9 - 1,0 mm de espessura) numerada e colocados para secar em local seco à temperatura ambiente (15-20 minutos). Em seguida, foram fixados em acetona fria (-20°C) durante 15 minutos e estocados a -20°C, até o momento de serem examinados.

A diluição apropriada do conjugado foi determinada em cortes de congelação (5 μ de espessura) de membranas cório-alantóides de O.E.G. (10 dias incubação) inoculadas com a amostra específica não diluída (0,25 ml/ovo/via cavidade alantóide) e colhidas com 24, 48, 72 e 96 h.a.i. (JONES, 1975). Foram processadas separadamente (por amostra de vírus e tempo decorrido após inoculação), da mesma maneira que os órgãos e tecidos das aves infectadas e controles (GN e SPF).

Cortes de órgãos e tecidos das aves (GN e SPF) controles foram usados como controles da especificidade do conjugado e como controles negativos dessa técnica em todas as fases do presente estudo.

Os cortes foram cobertos com soro específico imune não diluído e colocados em câmara úmida durante 20 minutos a 37°C. Foram lavados com solução 0,05 M de tampão fosfato pH 7.2 e antes de secar, receberam o conjugado na diluição apropriada (1:16 em solução 0,05 M de tampão fosfato pH 7.2), sendo colocados em câmara úmida (20 minutos/37°C). Em seguida, foram lavados exaustivamente com solução 0,05 M tampão fosfato pH 7.2, cobertos com glicerina tamponada pH 8.5 e lamínula fina.

Todos os cortes tratados com conjugado foram examinados imediatamente em microscópio* JENA-CARL ZEISS, equipado com condensador cardióide de campo escuro (tipo VZ), lâmpada de vapor de mercúrio (Osram - HBO 200 W), filtro de ex

* Aus Jena-Veb Carl Zeiss, modelo NU-2, Berlim, República Democrática da Alemanha.

citação ultravioleta BG-12 e filtro de barreira GG-9. Durante e após o tratamento dos cortes com conjugado, os cortes foram protegidos da luz ambiental.

RESULTADOS

Dois isoladores, um com quatro e outro com três aves infectadas com amostras 208 e 29-78, respectivamente, sofreram contaminação com uma única bactéria, gram positiva, baciliforme, aeróbia, produtora de esporos, formadora de cadeia e imóvel. As aves já haviam se recuperado da doença respiratória causada pelo vírus da BIG e a presença da bactéria ficou restrita ao sistema digestivo, comprovado pela ausência de isolamento em "swabs" de traquéia dessas aves. Algumas medidas foram tomadas: limpeza total do interior dos isoladores e uso de antibiótico. Após antibiograma*, as aves passaram a receber cloranfenicol** adicionado ao alimento estéril, dentro do isolador.

Solução aquosa desse antibiótico, na base de 1 g/10 ml de água destilada, foi esterilizada por filtração***, ampola (5 ml) e introduzida nos isoladores. Para cada frasco de comida (1 litro) foi adicionada uma ampola (500 mg cloranfenicol), de dois em dois dias, até o fim do experimento.

Essas aves chamam-se "monoxênicas" ou contaminadas com um único agente bacteriano (PLEASANTS, 1977).

* Multodisk, Oxoid, Hampshire, England.

** Cloromicetina, cápsulas 250 mg, Parke-Davis, São Paulo, Brasil.

*** Swinnex 25 mm com membrana esterilizante GSWP-02500, poro 0,22 μ , Millipore, Bedford, Massachusetts, USA.



1 - ACHADOS E SINTOMAS CLÍNICOS:

1.1 - AVES GN E SPF INFECTADAS

Sintomas clínicos de doença respiratória foram observados em todas as aves infectadas com amostras 208 e 29-78 (TABELA I).

Nas aves GN, o período de incubação foi de 48 horas (208) e 72 horas (29-78). O curso da doença respiratória foi de 96 horas (29-78) e 168 horas (208). Espirros foram observados de 48 a 216 h.a.i. (208) e de 72 a 168 h.a.i. (29-78).

Nas aves SPF infectadas com ambas amostras, o período de incubação foi de 24 horas e o curso da doença respiratória foi de 240 horas. Espirros foram observados de 24 a 264 h.a.i., respiração bucal e ronqueira pulmonar de 72 a 192 h.a.i., para ambas amostras.

Outros achados e sintomas clínicos não foram observados nessas aves durante o experimento.

1.2 - AVES GN E SPF CONTROLES

Não foram observados achados e sintomas clínicos nessas aves em nenhuma fase do experimento.

2 - ACHADOS DE NECRÓPSIA (LESÕES MACROSCÓPICAS)

2.1 - AVES GN E SPF INFECTADAS

Nas aves GN, foram encontradas: conjuntivite discreta de 24 a 72 h.a.i. (208) e de 48 a 72 h.a.i. (29-78), congestão da mucosa dos cornetos e seios nasais infra-orbitários com presença de exsudato sero-mucoso de 24 a 168 h.a.i. (208) e de 48 a 168 h.a.i. (29-78), e traqueíte dis-

creta com exsudato sero-mucoso de 48 a 192 h.a.i. (208) e de 72 a 192 h.a.i. (29-78).

Nas aves SPF, foram encontrados: conjuntivite discreta de 24 a 96 h.a.i., congestão da mucosa dos cornetos e seios nasais infra-orbitários com presença de exsudato sero-mucoso (24 a 72 h.a.i.) e muco-purulento amarelado (96 a 264 h.a.i.), e traqueíte discreta com exsudato sero-mucoso (48 a 96 h.a.i.) e muco-purulento amarelado (120 a 312 h.a.i.) (ambas amostras).

O baço apareceu hipertrofiado em algumas aves, infectadas com amostras 208 e 29-78, de 120 a 360 h.a.i. (aves GN) e de 144 a 504 h.a.i. (aves SPF). O mesmo aconteceu com a bursa de Fabricius (ligeiramente congesta) de 120 a 432 h.a.i. (aves GN) e de 144 a 504 h.a.i. (SPF).

Nenhum outro achado ou lesão macroscópica foi encontrada nessas aves durante o experimento.

Foi feito um sumário da presença de lesões macroscópicas nas aves GN e SPF (amostras 208 e 29-78), excetuando baço e bursa de Fabricius, na TABELA I.

2.2 - AVES GN E SPF CONTROLES:

Nenhum achado ou lesão macroscópica foi encontrada nessas aves durante o experimento.

3 - ÁREAS E CÉLULAS ONDE FOI DETECTADO O ANTÍGENO VÍRICO PE LA IMUNOFLUORESCÊNCIA

3.1 - AVES GN e SPF INFECTADAS:

A - Traqueíte:

Na traqueíte das aves GN e SPF infectadas com amostras 208 e 29-78, foram detectadas células fluorescentes na

superfície do epitélio a partir de 24 h.a.i. (Figura 1). Além da superfície, células fluorescentes foram detectadas nas partes mais profundas do epitélio e o pique máximo de fluorescência nas células do epitélio traqueal ocorreu de 96 a 144 h.a.i.. Células descamadas e resíduos celulares fluorescentes, livres na luz traqueal, foram encontrados entre 24 e 120 h.a.i.. A partir de 168 h.a.i., o número de células fluorescentes foi diminuindo até desaparecer por completo a 264 h.a.i..

B - Pulmões:

Nos pulmões de aves GN e SPF infectadas com amostras 208 e 29-78, foram detectadas células fluorescentes na superfície do epitélio dos brônquios primários e secundários (48 h.a.i.) e terciários (72 h.a.i.). Muitas células fluorescentes foram encontradas na superfície e no interior do epitélio dos brônquios primários e secundários de 72 a 120 h.a.i. (Figura 2). Muitas células descamadas e resíduos celulares fluorescentes foram encontradas na luz bronquial nesse mesmo período. Houve uma diminuição gradativa das células fluorescentes no epitélio bronquial a partir de 144 h.a.i. e desapareceram por completo a 264 h.a.i.. Nos brônquios terciários foram detectadas células fluorescentes de 72 a 168 h.a.i.. Nenhuma célula fluorescente foi detectada na lâmina própria e nos centros linfóides germinativos presentes nos brônquios primários e secundários.

A presença de células fluorescentes na traquéia e pulmões das aves GN e SPF infectadas com amostras 208 e 29-78 foi sumariada na TABELA I.

C - Outros Órgãos e Tecidos:

Nenhuma célula fluorescente foi encontrada no ba-

ço, bursa de Fabricius, rins, tonsilas cecais, glândulas de Harder, ovário, testículos e sacos aéreos torácicos posteriores e abdominais das aves GN e SPF infectadas com amostras 208 e 29-78, durante todo o experimento.

3.2 - AVES GN e SPF CONTROLES

Não foram detectadas células fluorescentes nos órgãos e tecidos estudados durante o experimento.

4 - ACHADOS HISTOLÓGICOS (LESÕES MICROSCÓPICAS)

4.1 - AVES GN E SPF INFECTADAS (208 e 29-78)

A - Traquēia:

No epitélio pseudo-estratificado ciliado (Figuras 3 e 4), ocorreu descamação das células superficiais colunares ciliadas e caliciformes, ficando as células basais (24 h.a.i.) (Figura 5). A superfície da lâmina própria foi coberta por 3-4 camadas de células cubóides (hiperplasia epitelial) e muitos capilares surgiram nesse epitélio (48 h.a.i.) (Figuras 6 e 7). A camada celular ficou mais espessa e apareceram espaços com aparência cística, contendo resíduos celulares ou não (72 h.a.i.) (Figura 8). Depressões na superfície epitelial, infiltração celular na lâmina própria e no epitélio espessado, com predominância de células mononucleares, além de exsudato com células descamadas, mono e polimorfonucleares e resíduos celulares na luz traqueal, foram encontrados de 96 a 144 h.a.i. (Figuras 9, 10, 11, 12 e 13). Infiltração de células mononucleares não foi encontrada na lâmina própria a 168 h.a.i., mas persistiu no epitélio espessado (Figura 14). Nas aves GN infectadas com amostra 29-78, células colunares ciliadas e caliciformes apareceram em

várias partes do epitélio a 168 h.a.i.. Nas aves SPF infectadas com amostras 208 e 29-78, focos de infiltração de células mono e polimorfonucleares no epitélio, associados à presença de exsudato na luz traqueal contendo células descamadas, inflamatórias e resíduos celulares, foram observados de 120 a 312 h.a.i.. O epitélio ficou pseudo-estratificado ciliado com glândulas mucosas e centros linfóides germinativos, a partir de 216 h.a.i. (29-78) e de 264 h.a.i. (208) nas aves GN e de 360 h.a.i. (ambas amostras) nas aves SPF (Figura 15).

B - Pulmão:

Ocorreu descamação das células epiteliais colunares ciliadas e caliciformes dos brônquios primários e secundários, entre 48 e 72 h.a.i.. Em seguida, apareceram várias camadas de células cubóides e formações císticas foram vistas nessas áreas (96 h.a.i.). De 120 a 144 h.a.i., apareceu infiltração celular, com predominância de células mononucleares, no epitélio bronquial espessado, além de hipertrofia dos centros linfóides germinativos presentes na lâmina própria dos brônquios primários e secundários (Figuras 16, 17 e 18). Infiltração de células mononucleares, envolvendo região dos capilares aéreos e venosos e os septos interatriais, foi encontrada em alguns brônquios terciários de 120 a 144 h.a.i. (Figura 19). Exsudato na luz bronquial contendo células descamadas, inflamatórias e resíduos celulares, foi encontrado de 48 a 168 h.a.i. (aves GN) e de 48 a 264 h.a.i. (aves SPF). De 120 a 264 h.a.i. (aves SPF), alguns brônquios primários, secundários e terciários foram envolvidos por uma infiltração localizada ou difusa de células mono e polimorfonucleares no epitélio, além de hipertrofia dos centros linfóides germinativos, descamação epitelial e presença de exsudato contendo células descamadas, inflamatórias e resíduos celulares na luz bronquial (Figura 20). O epitélio dos brônquios primários e

secundários ficou pseudo-estratificado ciliado com células caliciformes, a partir de 216 h.a.i. (29-78) e de 264 h.a.i. (208) nas aves GN e de 360 h.a.i. (ambas amostras) nas aves SPF, além da presença de centros linfóides germinativos.

A presença desses achados e lesões histológicas foi agrupada na TABELA I (aves GN e SPF - ambas amostras).

C - Outros Órgãos e Tecidos:

Nenhum achado histológico foi encontrado nos sacos aéreos torácicos posteriores e abdominais, tonsilas cecais, glândulas de Harder, baço, rins, bursa de Fabricius, testículos e ovário das aves GN e SPF infectadas com amostras 208 e 29-78.

Tecido linfóide, com centros linfóides germinativos, foi encontrado em todas tonsilas cecais estudadas. Áreas focais de tecido linfóide, com ou sem centros linfóides germinativos, foram encontrados nos rins, testículos, ovário, glândulas de Harder e sacos aéreos torácicos de algumas aves GN e SPF (ambas amostras) de 216 a 720 h.a.i.. No baço e na bursa de Fabricius das aves GN e SPF (ambas amostras) foi encontrado um grande número de vasos e capilares sanguíneos, presença de muitas células mononucleares nesses vasos e na massa de tecido linfóide, além de centros linfóides germinativos no baço, de 120 a 720 h.a.i..

4.2 - AVES GN E SPF CONTROLES:

Nenhum achado ou lesão histológica foi encontrado nos órgãos e tecidos estudados dessas aves. Nas aves GN, foram encontrados centros linfóides germinativos nas tonsilas cecais e na lâmina própria de alguns brônquios secundários nos pulmões. Nas aves SPF, tecido linfóide, com ou sem centros linfóides germinativos, foi encontrado nas tonsilas ce

cais, rins, baço, glândulas de Harder, testículos e ovário. Também foram encontrados centros linfóides germinativos na lâmina própria da traquéia, brônquios primários e secundários e nos sacos aéreos torácicos posteriores.

5 - RESPOSTA IMUNITÁRIA

5.1 - AVES GN E SPF INFECTADAS:

Após inoculação vírica, anticorpos precipitantes anti-vírus da BIG foram detectados pela imunodifusão nos soros das aves GN e SPF de 168 a 720 h.a.i. (29-78) e de 216 a 720 h.a.i. (208) (TABELA I).

5.2 - AVES GN E SPF INFECTADAS:

Não foram detectados anticorpos precipitantes anti-vírus da BIG no sorô dessas aves em nenhuma fase do experimento.

TABELA I - Comparação entre a presença de sintomas clínicos (SC), lesões macroscópicas (LM), lesões histológicas (LH), células fluorescentes à imunofluorescência (CF) e anticorpos precipitantes à imunodifusão (AP) em aves gnotobióticas (GN) e isentas de patógenos (SPF) infectadas com amostras 208 e 29-78 do vírus da bronquite infecciosa das galinhas.

| H.A.I. | AVES | | PRESENÇA DE | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------|------|-------|-------------|-------|-----|-------|-----|-------|-----|-------|-----|-------|---|---|---|---|---|---|---|
| | SEXO | | SC | | LM | | LH | | CF | | AP | | | | | | | | |
| | 208 | 29-78 | 208 | 29-78 | 208 | 29-78 | 208 | 29-78 | 208 | 29-78 | 208 | 29-78 | | | | | | | |
| | GN | SPF | GN | SPF | GN | SPF | GN | SPF | GN | SPF | GN | SPF | | | | | | | |
| 24 | F | M | M | M | - | + | - | + | + | + | - | + | + | + | + | - | - | - | - |
| 24 | M | M | F | M | - | + | - | + | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | - |
| 48 | F | M | M | M | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - |
| 48 | F | F | F | M | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - |
| 72 | F | F | M | M | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - |
| 72 | F | M | M | M | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - |
| 96 | M | F | F | M | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - |
| 96 | M | M | M | F | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - |
| 120 | M | F | M | M | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - |
| 120 | M | M | M | M | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - |
| 144 | F | M | F | M | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - |
| 144 | F | F | F | M | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - |
| 168 | F | F | F | M | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - |
| 168 | F | M | F | F | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - |
| 192 | F | F | M | F | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - |
| 192 | M | F | F | F | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - |
| 216 | F | F | F | F | + | + | - | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | - |
| 216 | M | F | M | F | + | + | - | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | - |
| 264 | F | F | M | M | - | + | - | + | - | + | - | + | - | - | - | + | + | + | - |
| 264 | M | F | M | F | - | + | - | + | - | + | - | + | - | - | - | + | + | + | - |
| 312 | M | F | M | M | - | - | - | - | - | + | - | + | - | - | - | + | + | + | - |
| 312 | M | F | M | F | - | - | - | - | - | + | - | + | - | - | - | + | + | + | - |
| 360 | M | M | M | M | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + | - |
| 360 | M | F | M | M | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + | - |
| 432 | F* | M | F | M | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + | - |
| 504 | F* | F | F* | M | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + | - |
| 600 | M* | F | M* | F | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + | - |
| 720 | M* | M | M* | M | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + | - |

H.A.I. = Horas após inoculação

F = Fêmea

M = Macho

- = Ausente

+ = Presente

* = Monoxênicos

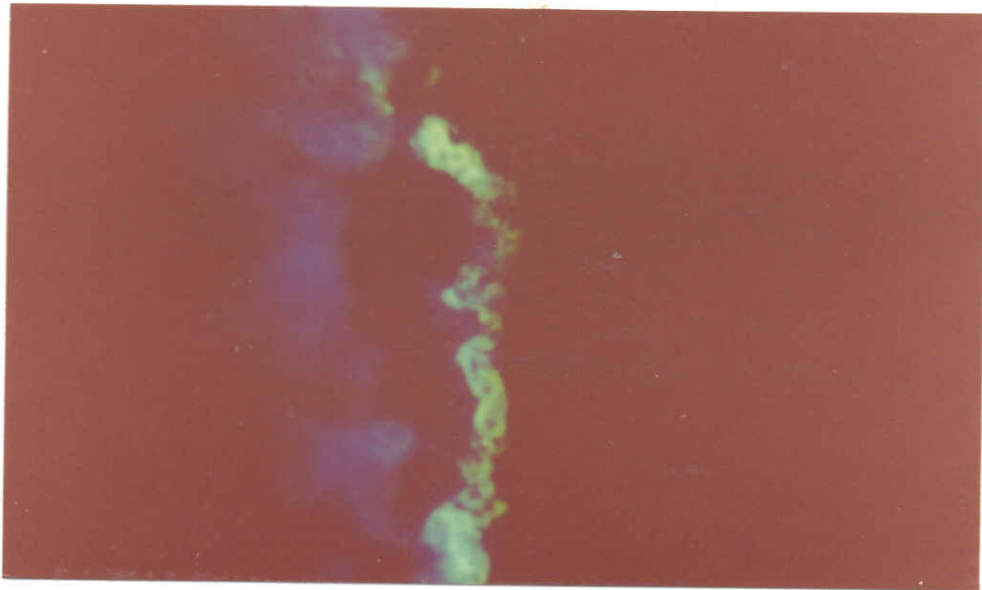


Figura 1 - Células fluorescentes na superfície do epitélio da traquéia (corte transversal) de ave GN, 48 horas após inoculação com amostra 208. 200 X.

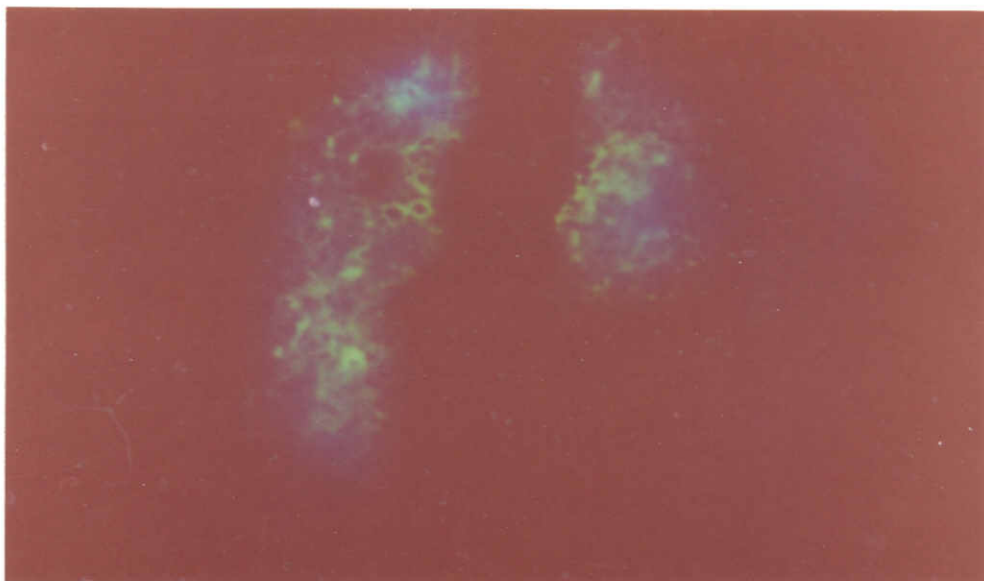


Figura 2 - Células fluorescentes no epitélio de brônquio secundário (corte longitudinal) do pulmão de ave GN, 120 horas após inoculação com amostra 29-78. 200 X.

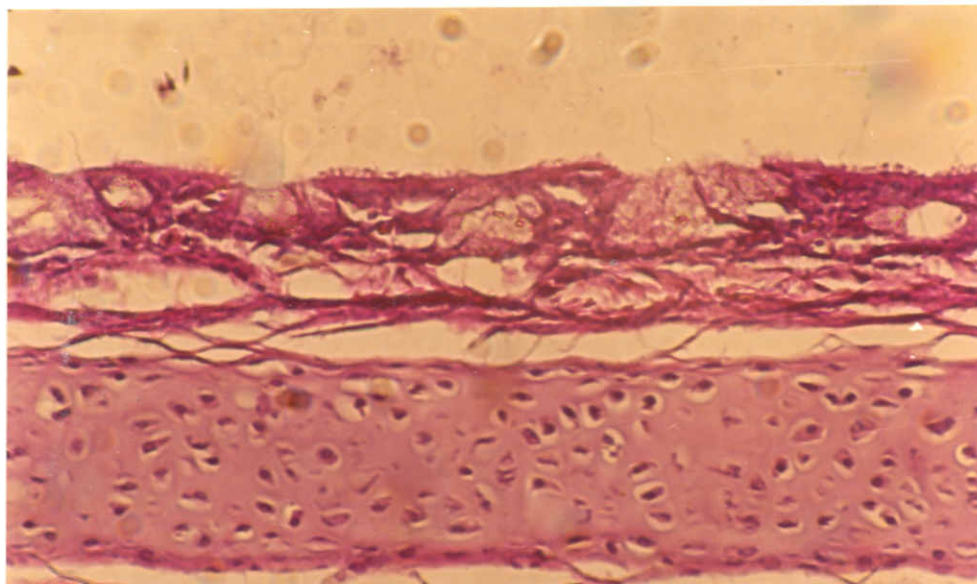


Figura 3 - Corte histológico de traquéia normal de ave GN controle com 24 dias de idade. Observar o epitélio ciliado e o grande número de células caliciformes. H&E. 200 X.

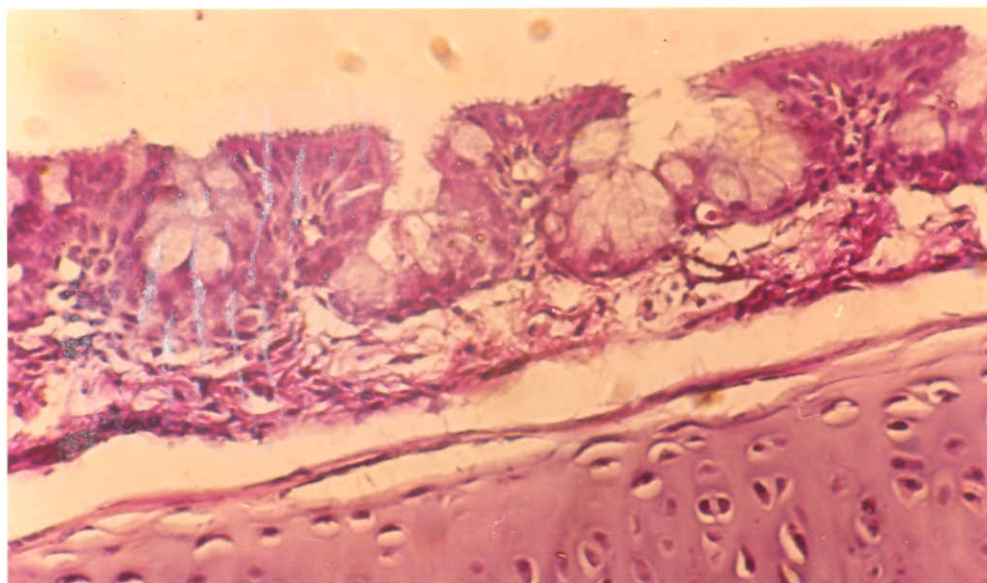


Figura 4 - Corte histológico de traquéia normal de ave SPF controle com 24 dias de idade. Observar o epitélio ciliado, repleto de glândulas mucosas com células caliciformes. H&E. 200 X.

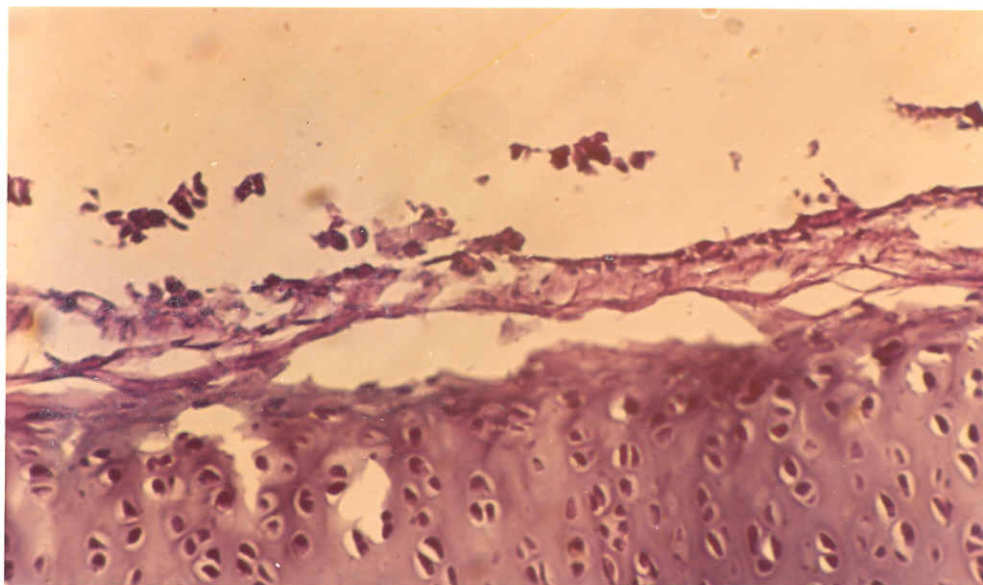


Figura 5 - Corte histológico de traquéia de ave GN, 24 horas após inoculação com amostra 29-78. Descamação total da camada superficial do epitélio (células ciliadas e células caliciformes). H&E. 200 X.

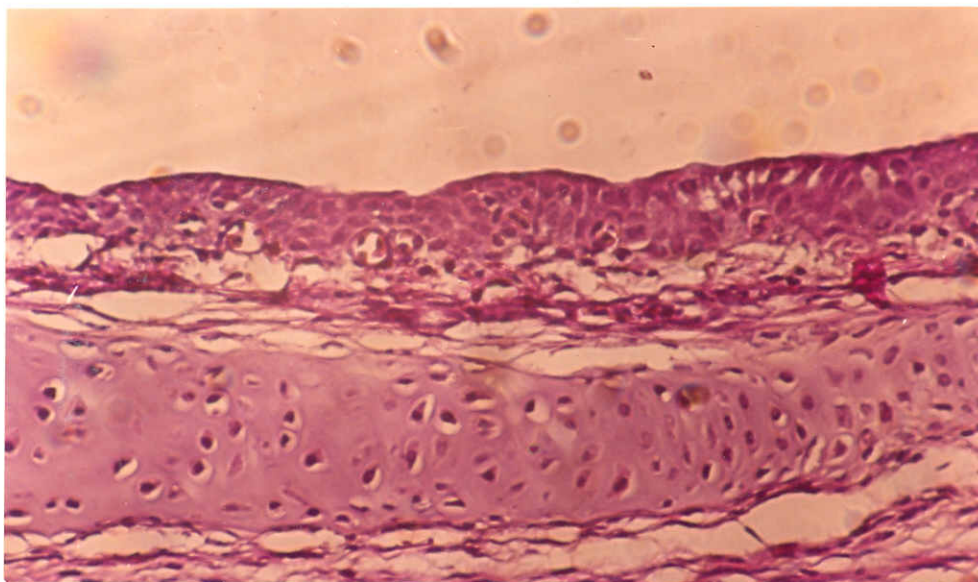


Figura 6 - Corte histológico de traquéia de ave GN, 48 horas após inoculação com amostra 208. Início da hiperplasia epitelial. H&E. 200 X.

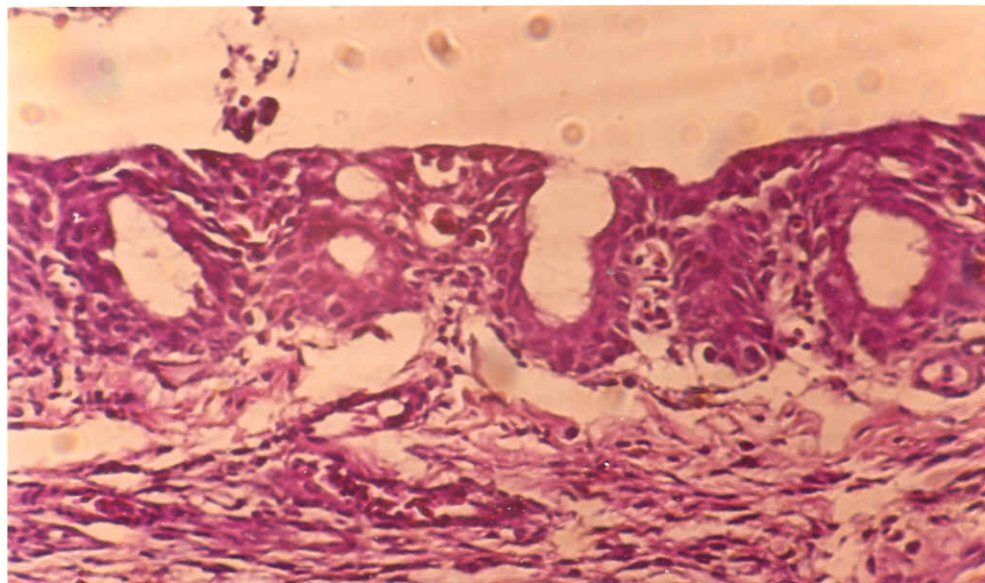


Figura 7 - Corte histológico de traquéia de ave SPF, 48 horas após inoculação com amostra 29-78. Houve descamação das células ciliadas e células caliciformes das glândulas mucosas. H&E. 200 X.

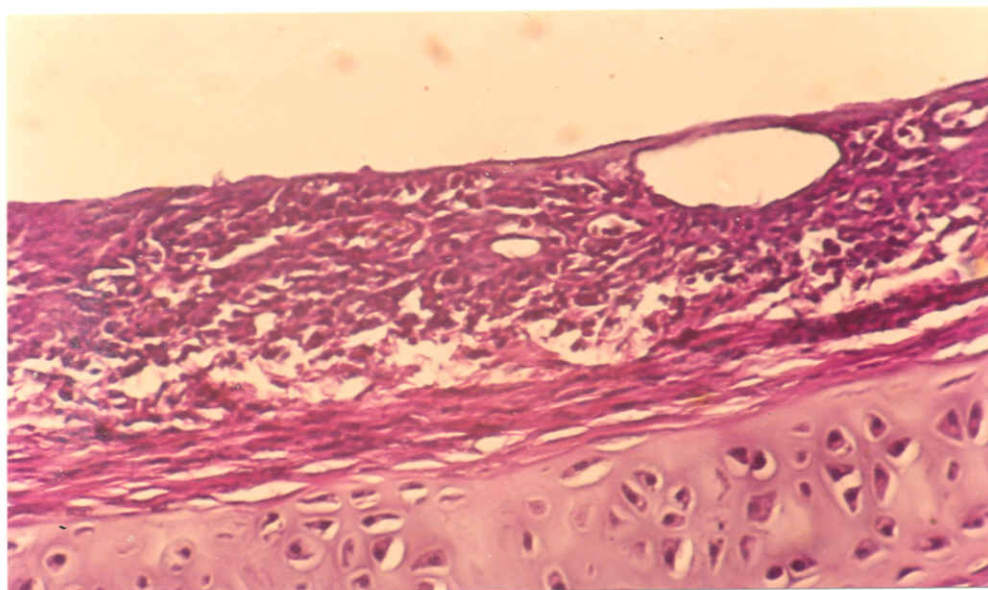


Figura 8 - Corte histológico de traquéia de ave GN, 72 horas após inoculação com amostra 29-78. Epitélio está hiperplásico e com formações císticas. H&E. 200 X.

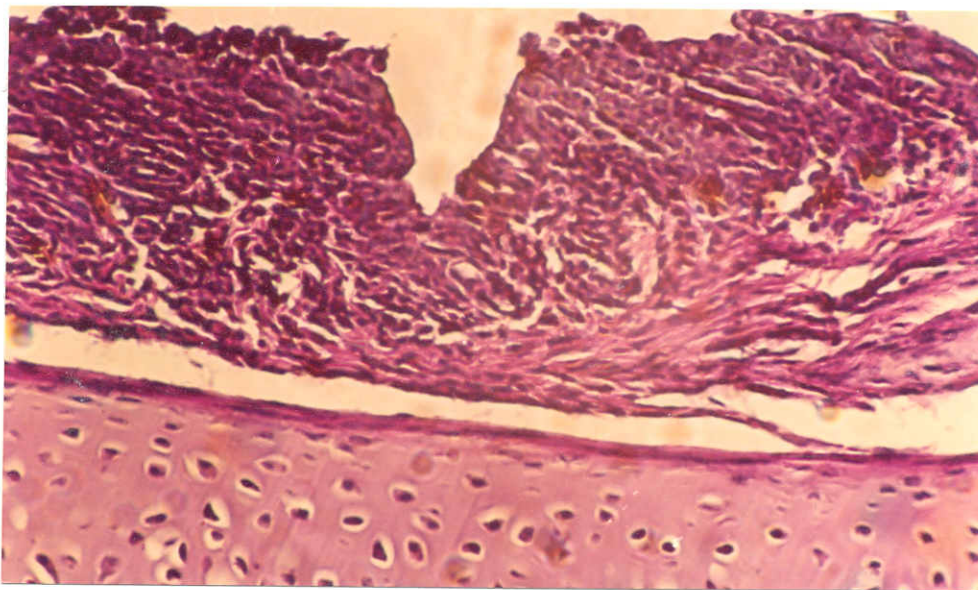


Figura 9 - Corte histológico de traquéia de ave GN, 96 horas após inoculação com amostra 208. Hiperplasia epitelial intensa e invaginação na linha do epitélio, onde outrora existiu uma glândula mucosa que descamou junto com as células superficiais. H&E. 200 X.

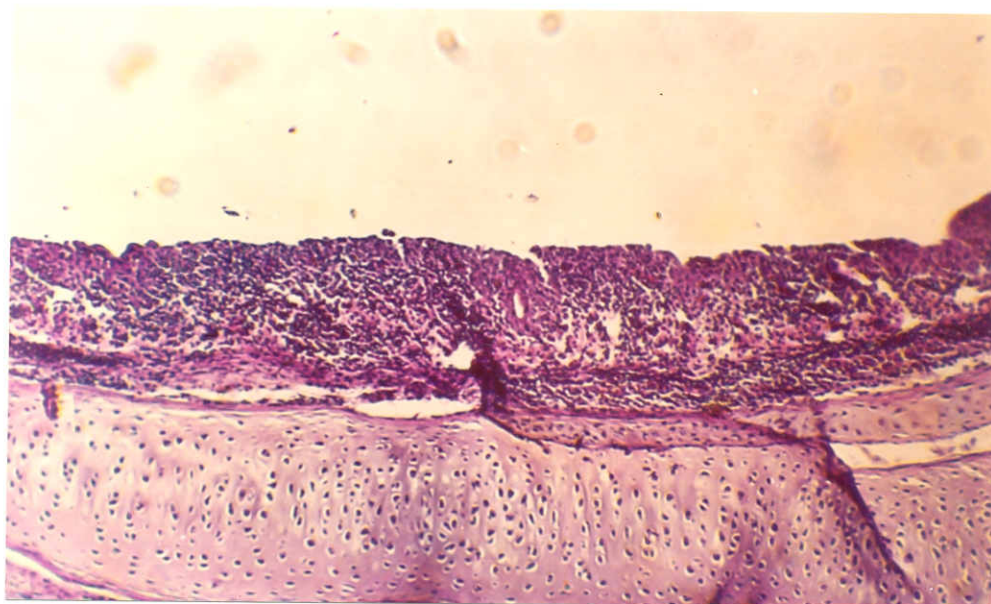


Figura 10 - Corte histológico de traquéia de ave GN, 144 horas após inoculação com amostra 29-78. Há infiltração difusa de células mononucleares na lâmina própria e no epitélio hiperplásico. H&E. 80 X.

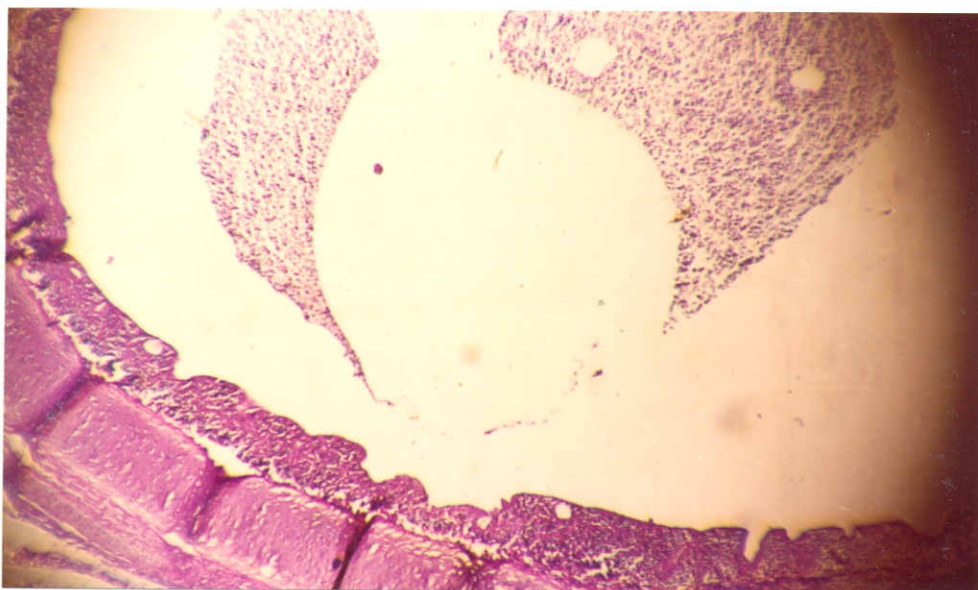


Figura 11 - Corte histológico de traquéia de ave SPF, 96 horas após inoculação com amostra 208. Há intensa hiperplasia epitelial, presença de formações císticas e invaginações no epitélio hiperplásico, além de exsudato repleto de células descamadas e resíduos celulares na luz traqueal. H&E. 32 X.



Figura 12 - Corte histológico de traquéia de ave SPF, 120 horas após inoculação com amostra 29-78. Hiperplasia epitelial e infiltração difusa de células mononucleares no epitélio hiperplásico. H&E. 32 X.

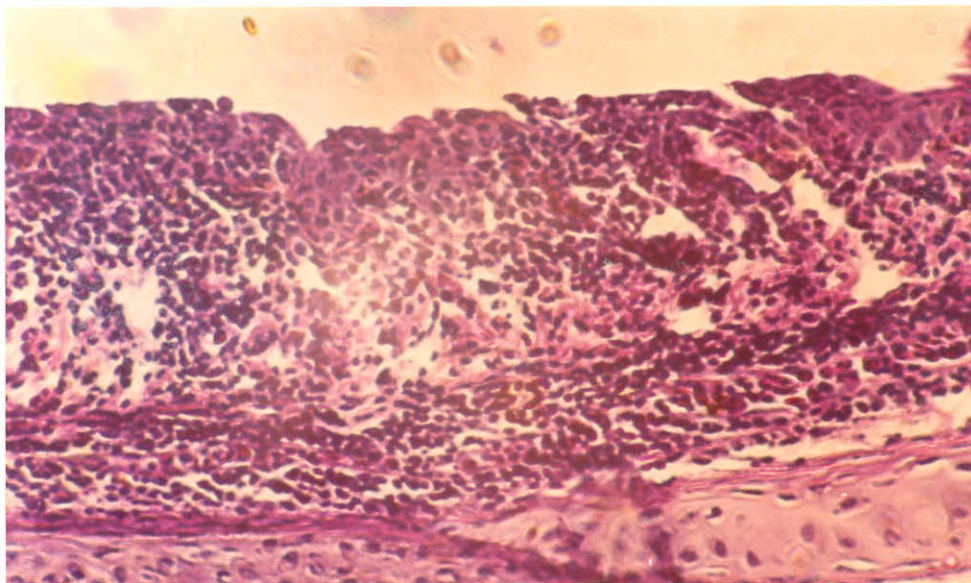


Figura 13 - Corte histológico da traquéia de ave SPF, 144 horas após inoculação com amostra 29-78. Infiltração predominante de células mononucleares na lâmina própria e no epitélio hiperplásico. H&E. 200 X.

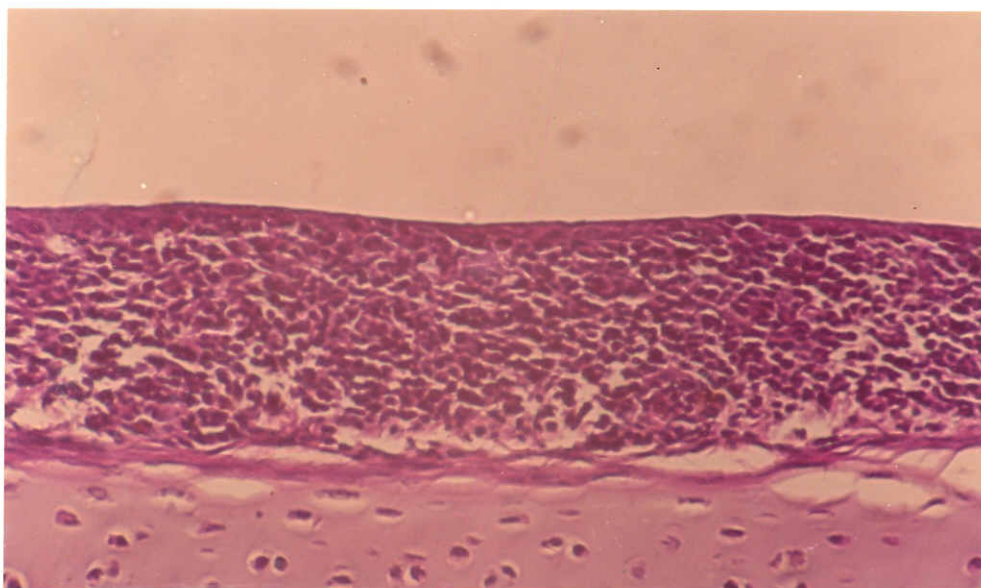


Figura 14 - Corte histológico de traquéia de ave GN, 168 horas após inoculação com amostra 208. Epitélio está hiperplásico, há infiltração de células mononucleares e a superfície do epitélio está em fase de recuperação. H&E. 200 X.

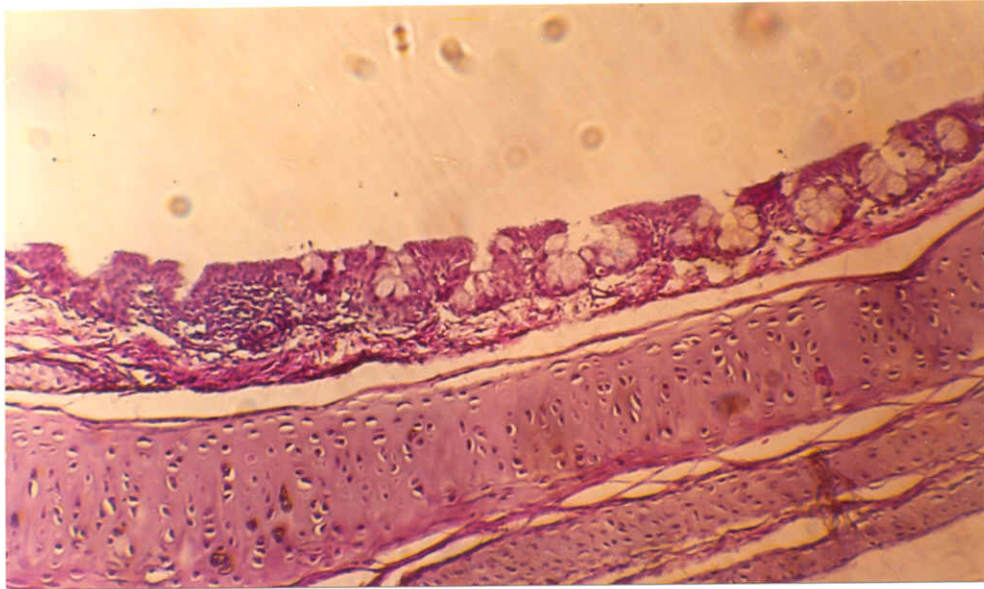


Figura 15 - Corte histológico de traquéia de ave SPF, 360 horas após inoculação com amostra 208. O epitélio está inteiramente recuperado - epitélio ciliado com glândulas mucosas e presença de um centro linfóide germinativo. H&E. 80 X.

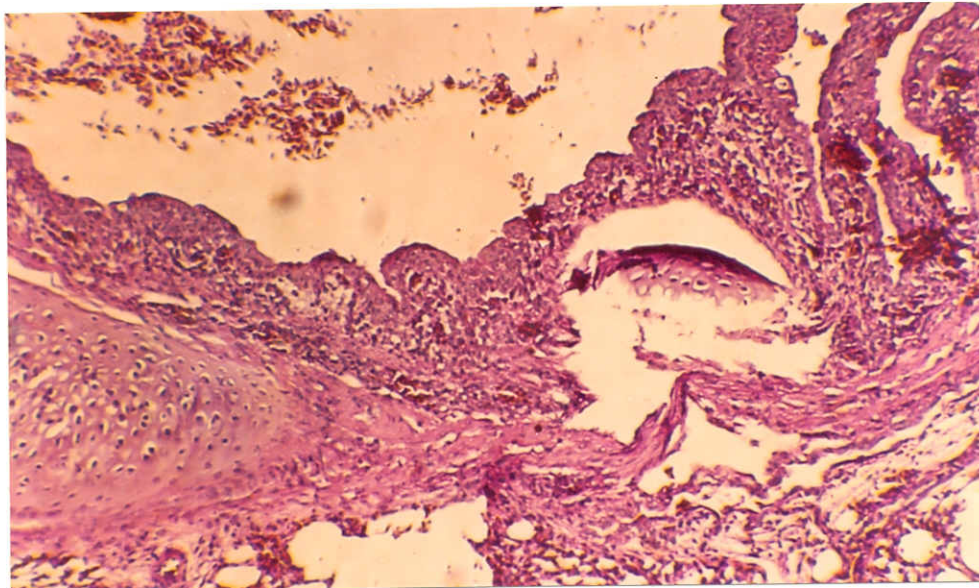


Figura 16 - Corte histológico de pulmão de ave GN, 120 horas após inoculação com amostra 208. Há hiperplasia epitelial e infiltração discreta de células mononucleares no epitélio do brônquio primário. H&E. 80 X.

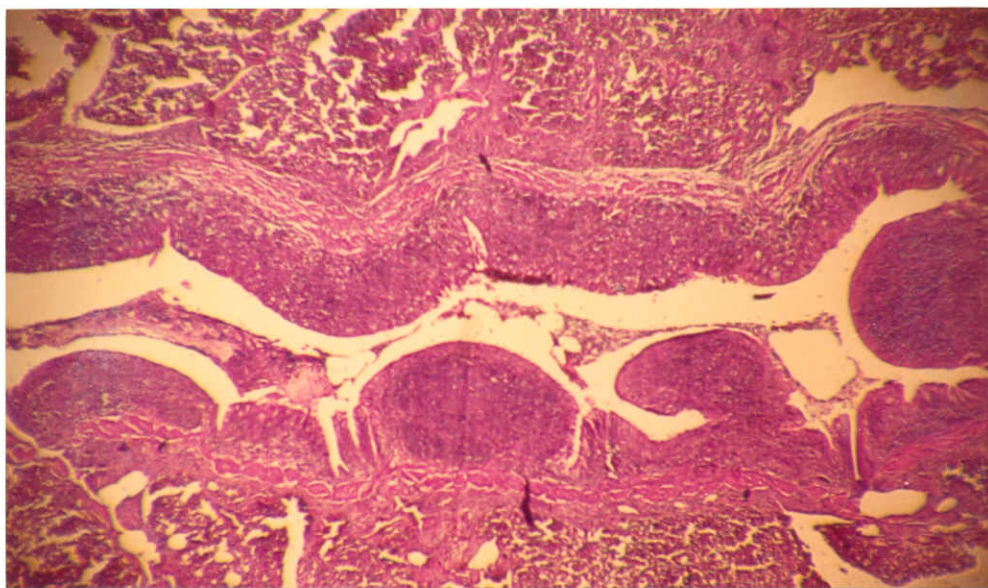


Figura 17 - Corte histológico de pulmão de ave GN, 144 horas após inoculação com amostra 29-78. Há infiltração difusa de células mononucleares no epitélio hiperplásico e hipertrofia dos centros linfóides germinativos na lâmina própria do brônquio secundário. H&E. 32 X.

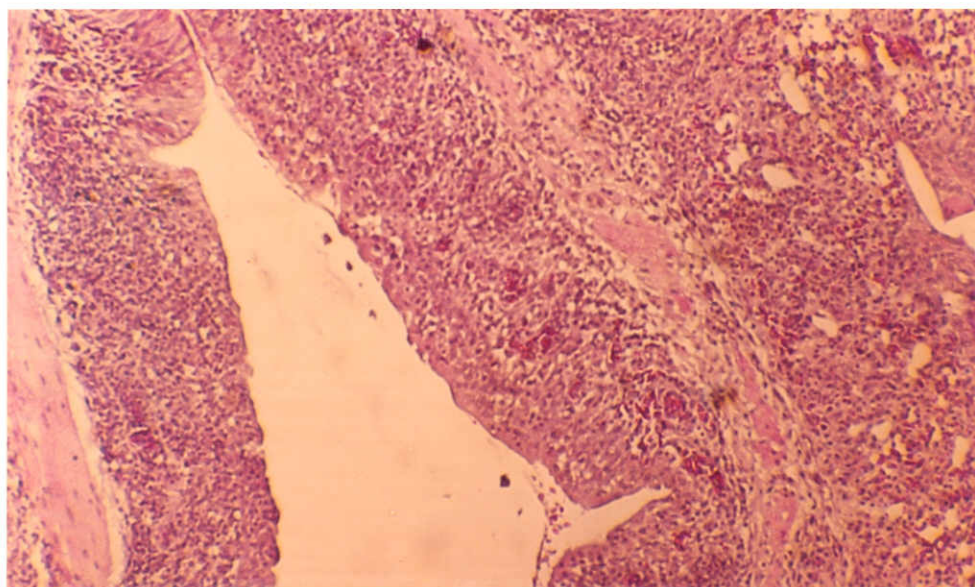


Figura 18 - Corte histológico de pulmão de ave SPF, 120 horas após inoculação com amostra 208. Infiltração difusa de células mononucleares e poucas polimorfonucleares no epitélio hiperplásico do brônquio secundário. H&E. 80 X.

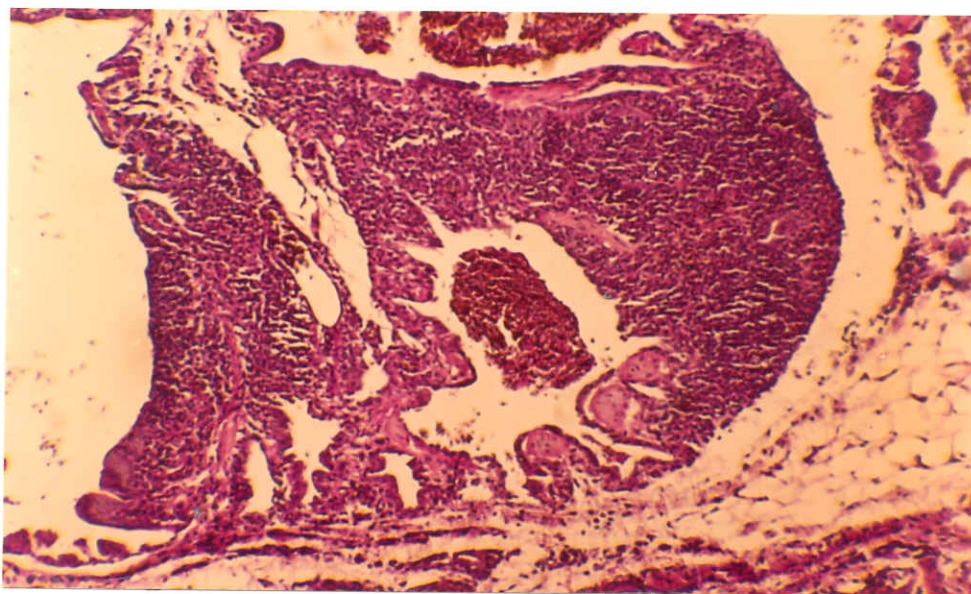


Figura 19 - Corte histológico de pulmão de ave GN, 144 horas após inoculação com amostra 208. Infiltração difusa de células mononucleares nas paredes e septos interatriais do brônquio terciário. H&E. 80 X.

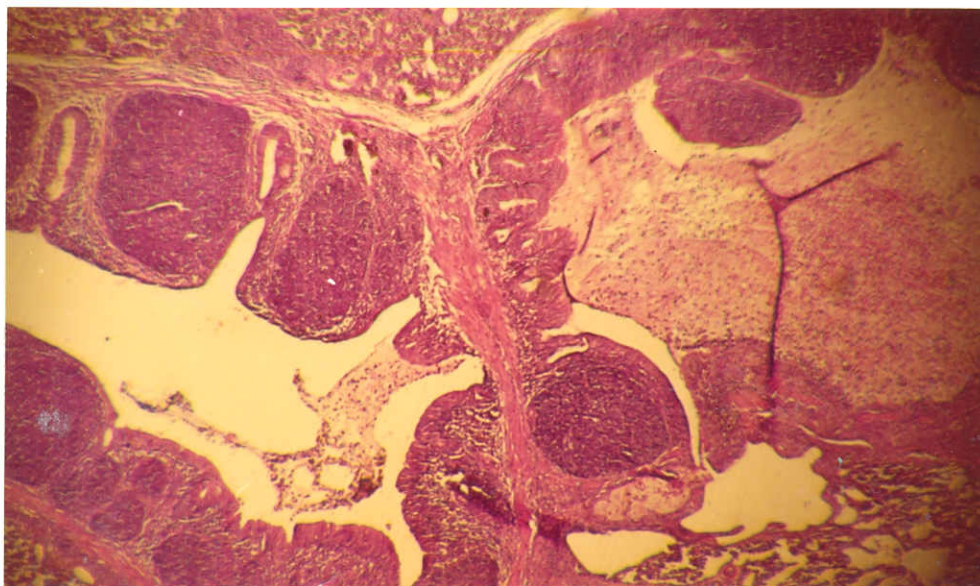


Figura 20 - Corte histológico de pulmão de ave SPF, 192 horas após inoculação com amostra 29-78. Há infiltração difusa de células mononucleares e polimorfonucleares em algumas partes do epitélio, hipertrofia dos centros linfóides germinativos na lâmina própria e presença de exsudato repleto de células inflamatórias e resíduos celulares na luz do brônquio secundário. H&E. 32 X.



DISCUSSÃO

As amostras de vírus da BIG estudadas (208 e 29-78) foram hábeis em infectar e causar sintomas clínicos de doença respiratória em todas as aves GN e SPF inoculadas pelas vias ocular, nasal e oral.

Espirro foi o único sintoma clínico de doença respiratória nas aves GN infectadas com amostras 208 e 29-78, contrariando os resultados de outro estudo com aves GN (SPRINGER et alii, 1974), no qual foi encontrada coriza além de espirros.

Nas aves GN infectadas com amostra 29-78, os espirros foram discretos, o período de incubação foi maior e o curso da doença respiratória foi menor, quando comparados com a amostra 208.

Nas aves SPF, essas amostras causaram uma doença respiratória muito semelhante, tanto nos sintomas clínicos, como no período de incubação e curso da doença respiratória, caracterizada por espirros, respiração bucal e ronqueira pulmonar, o que foi encontrado em outros estudos com amostras do vírus da BIG com tropismo para o sistema respiratório (PURCELL & McFERRAN, 1972; JONES, 1974; MACDONALD & McMARTIN, 1976).

Nenhuma ave GN e SPF infectada (ambas amostras) morreu, contrariando os achados de outros estudos, onde a mortalidade foi muito variável, dependendo das condições sanitárias das aves e das amostras de vírus estudadas. Nesses

estudos, amostras com tropismo para o sistema respiratório causaram uma pequena taxa de mortalidade em aves SPF, provavelmente devido à infecção bacteriana secundária (PURCELL & McFERRAN, 1972) ou quando chegaram a afetar os rins (JONES, 1974; CHONG & APOSTOLOV, 1982). Com amostras nefrotrópicas, a mortalidade foi alta, provavelmente devido ao grave distúrbio eletrolítico causado pela lesão renal (SILLER & CUMMING, 1974; POHL, 1974; ALEXANDER et alii, 1978; CHONG & APOSTOLOV, 1982).

Cianose e letargia não foram observadas nas aves GN e SPF infectadas (ambas amostras). Cianose da crista e barbela foi encontrada nas aves moribundas em estudos de amostras com tropismo para o sistema respiratório (PURCELL & McFERRAN, 1972; MACDONALD et alii, 1980), ao passo que letargia foi encontrada em aves infectadas com amostras nefrotrópicas (SILLER & CUMMING, 1974; CHONG & APOSTOLOV, 1982).

Sinusite e edema facial não foram encontrados nas aves GN e SPF infectadas com amostras 208 e 29-78, coincidindo com todos os trabalhos consultados.

Não foram encontradas alterações quanto ao consumo de água e alimento e quanto ao desenvolvimento das aves GN e SPF infectadas com ambas amostras, ao contrário de outros estudos (PRINCE et alii, 1962; PURCELL & McFERRAN, 1972) que constataram uma redução na ingestão de alimentos com consequente diminuição no ganho de peso das aves infectadas com vírus da BIG. As aves GN, infectadas (208 e 29-78) e controles, cresceram menos do que as aves SPF infectadas e controles, ao contrário do esperado (PLEASANTS, 1977), provavelmente por causa de alguma deficiência alimentar.

Diarréia não foi observada em nenhuma ave infectada (GN e SPF - ambas amostras). Em estudos com amostras nefrotrópicas (SILLER & CUMMING, 1974; ALEXANDER et alii, 1978; CHONG & APOSTOLOV, 1982), diarréia branca foi um achado constante nas aves infectadas, devido à intensa excreção de uratos pelos rins afetados.

A temperatura corporal das aves GN e SPF infecta

das com amostras 208 e 29-78 permaneceu dentro dos limites da normalidade (41,0 - 42,0°C) (FREEMAN, 1971) e os resultados foram semelhantes aos encontrados em outros estudos com vírus da BIG (MACHADO, 1951; PURCELL & McFERRAN, 1972).

Distúrbios nervosos não foram observados em nenhuma ave infectada (GN e SPF) independente da amostra, o que também não foi encontrado em outros estudos com amostras com tropismo para o sistema respiratório (PURCELL & McFERRAN, 1972; JONES, 1974; MACDONALD & McMARTIN, 1976). Um caso de paralisia dos membros posteriores de ave infectada com amostra virulenta nefrotrópica foi descrito por ALEXANDER et alii (1978), sendo devida a compressão do plexo ciático pelos ureteres repletos de uratos. Outro estudo com amostra nefrotrópica virulenta (POHL, 1974) incriminou essa amostra de vírus da BIG como causadora de lesões a nível do encéfalo de algumas aves, mas não comprovou a presença do vírus por outras técnicas, além de utilizar aves e instalações inadequadas a esse tipo de experimento, permitindo, provavelmente, a entrada de outros agentes no plantel em estudo.

Os achados e lesões macroscópicas (necropsia) ficaram restritos ao sistema respiratório, excetuando pela conjuntivite e hipertrofia do baço e da bursa de Fabricius, tanto nas aves GN como SPF, infectadas com ambas amostras.

No sistema respiratório, as amostras 208 e 29-78 causaram congestão da mucosa dos cornetos e seios nasais infraorbitários, além de muito exsudato sero-mucoso (aves GN) e muco-purulento amarelado (aves SPF) nas partes descritas acima e na traquéia, além de uma traqueíte discreta (aves GN e SPF). Os espirros e a respiração bucal, provavelmente foram devidos ao envolvimento do sistema respiratório superior com conseqüente obstrução nasal pelo exsudato muco-purulento amarelado (aves SPF) espesso. A ronqueira pulmonar ocorreu devido à presença de exsudato muco-purulento espesso nos brônquios e na traquéia, dificultando a passagem do ar e provocando os ruídos anormais (aves SPF).

Conjuntivite discreta foi encontrada tanto nas

aves GN como SPF (ambas amostras, com a mesma intensidade e provavelmente foi devida à multiplicação vírica nessa área. Não foi descrita nos diversos trabalhos consultados.

Traqueíte com exsudato sero-mucoso e muco-purulento também foi encontrada na maioria dos estudos com amostras com tropismo para o sistema respiratório (HOFSTAD, 1945; PURCELL & McFERRAN, 1972; MACDONALD & McMARTIN, 1976), além da presença de tampão caseoso rígido alojado na bifurcação da traquéia das aves que morreram, provavelmente por asfixia (JONES & JORDAN, 1972), mas não descreveram congestão da mucosa dos cornetos e seios nasais, encontrada no presente estudo.

Congestão pulmonar, encontrada em outro estudo com vírus da BIG (PURCELL & McFERRAN, 1972), não foi observada em nenhum dos pulmões das aves GN e SPF infectadas com ambas amostras.

Aerosaculite (sacos aéreos torácicos posteriores e abdominais), caracterizada por opacidade, espessamento, com ou sem exsudato muco-purulento amarelado, foi encontrada em outros estudos com vírus da BIG (PURCELL & McFERRAN, 1972; SPRINGER et alii, 1974; MACDONALD & McMARTIN, 1976), mas não no presente estudo (aves GN e SPF - ambas amostras).

Hipertrofia e palidez renal, devido ao acúmulo de uratos em seu parênquima, encontradas em outros estudos com amostras nefrotrópicas ou esporadicamente nefrotrópicas (PURCELL & McFERRAN, 1972; SILLER & CUMMING, 1974; MACDONALD & McMARTIN, 1976; ALEXANDER et alii, 1978; MACDONALD et alii, 1980; CHONG & APOSTOLOV, 1982), não foram encontradas nas aves infectadas (GN e SPF - ambas amostras).

Hipertrofia do baço e da bursa de Fabrícus (também ligeiramente congesta) foi encontrada em algumas aves GN e SPF infectadas com 208 e 29-78, ao contrário de outro estudo (MACDONALD & McMARTIN, 1976) que encontrou material purulento no interior da bursa de Fabrícus.

Oviduto cístico, encontrado em aves infectadas com o vírus da BIG em outro estudo (CRINION et alii, 1971b), não

foi encontrado em nenhuma ave fêmea sacrificada (GN e SPF - ambas amostras).

Histologicamente, as amostras 208 e 29-78 (aves GN e SPF) causaram uma descamação extensiva da camada celular superficial do epitélio traqueal, seguida de proliferação das células basais residuais, resultando no aparecimento de várias camadas de células indiferenciadas, o que deixou o epitélio espessado e hiperplásico. Essa proliferação das células basais, após uma traqueíte aguda descamativa, nada mais foi do que uma reação inespecífica e normal, representando o início de um processo de reparação ou regeneração epitelial.

Tanto nas aves GN como SPF, infectadas com amostras 208 e 29-78, ocorreu infiltração difusa de células mononucleares na lâmina própria e no epitélio hiperplásico, durante um período curto, a despeito de uma provável infecção bacteriana secundária à infecção vírica, envolvendo infiltração de células polimorfonucleares (aves SPF - ambas amostras).

Quanto à hiperplasia epitelial seguida de infiltração de células mononucleares, os resultados do presente estudo foram semelhantes aos encontrados em outros estudos (PURCELL & McFERRAN, 1972; MACDONALD & McMARTIN, 1976; GOUFFAUX et alii, 1977), discordando apenas quanto a duração dos achados, o que também ocorreu entre eles. Esses autores classificaram a infiltração de células mononucleares como sendo constituída principalmente por linfócitos. Neste estudo, provavelmente tenha sido linfócitos também, entretanto não foram realizados estudos complementares de classificação dessas células, daí serem chamadas de mononucleares.

Outros estudos com vírus da BIG, encontraram achados histológicos diferentes dos encontrados no presente estudo, a nível da traqueia. GARSIDE (1965) não encontrou hiperplasia epitelial, mas uma intensa infiltração celular que provocou o espessamento epitelial. No presente estudo, a infiltração de células mononucleares ajudou a aumentar o espessamento epitelial, mas o epitélio já estava hiperplásico,

o que também foi observado por PURCELL & McFERRAN (1972) e GOUFFAUX et alii (1977). SPRINGER et alii (1974) encontrou uma severa hipertrofia epitelial, sem descamação das células da superfície epitelial, mas com infiltração de células mononucleares. Nesse caso, foi estudada uma amostra de vírus da BIG muito atenuada em sua virulência para aves, devido a muitas passagens consecutivas em O.E.G., o que provavelmente alterou as propriedades originais dessa amostra.

Os achados histológicos nos brônquios primários e secundários foram semelhantes aos encontrados na traquéia das aves GN e SPF (208 e 29-78), o que também foi observado em outros estudos (PURCELL & McFERRAN, 1972; GOUFFAUX et alii, 1977), sendo caracterizados por hipertrofia dos centros linfóides germinativos na lâmina própria e infiltração difusa de células mononucleares no epitélio hiperplásico e adjacências. Entretanto, a presença de centros linfóides germinativas hipertrofiados, com infiltração de células mononucleares na traquéia e brônquios, pode ocorrer em infecções por outros vírus (GARSIDE, 1965).

Os achados histológicos a nível dos pulmões das aves GN e SPF (ambas amostras) ficaram, em sua maioria, restritos aos brônquios primários e secundários. A nível dos brônquios terciários ocorreu descamação de células superficiais dos septos inter-atriais, seguida de infiltração de células mononucleares. Ao contrário dos outros brônquios, esses achados ficaram restritos a uns poucos brônquios terciários, os quais variavam sua localização de corte para corte (mesma ave) e de ave para ave, o que também foi encontrado em outro estudo (PURCELL & McFERRAN, 1972). Nas aves SPF infectadas com amostras 208 e 29-78, alguns desses brônquios terciários, geralmente circunvizinhos a brônquios secundários, foram envolvidos em uma intensa reação inflamatória, caracterizada por uma extensiva infiltração de células inflamatórias (principalmente polimorfonucleares), além da presença de exsudato ocupando toda a luz bronquial, com muitas células descamadas, inflamatórias e resíduos celulares, sen

do causada provavelmente por infecção bacteriana secundária à infecção vírica, uma vez que não foram encontradas nas aves GN infectadas com as mesmas amostras de vírus.

O epitélio traqueal das aves GN infectadas com amostra 29-78, recuperou seu aspecto pseudo-estratificado ciliado com glândulas mucosas, mais precocemente do que nessas aves infectadas com amostra 208. Entretanto, nas aves SPF, não foram encontradas diferenças quanto à duração dos achados e lesões histológicas na traquéia, causados por ambas amostras, provavelmente devido ao envolvimento de bactérias normalmente colonizadoras do epitélio do sistema respiratório.

Achados e lesões histológicas nos sacos aéreos abdominais e torácicos posteriores, caracterizados por edema, descamação das células superficiais e infiltração de células mononucleares, com aparecimento de muitos centros linfóides germinativos na fase de recuperação, encontrados em outros estudos (PURCELL & McFERRAN, 1972; SPRINGER et alii, 1974), não foram encontrados nos cortes desses sacos aéreos (aves GN e SPF - ambas amostras).

Nos rins, lesões histológicas caracterizadas por necrose do epitélio tubular (túbulos cortocidos e coletores, ductos e ureteres), presença de resíduos celulares e cristais de uratos intratubulares, seguida de infiltração de células inflamatórias (mono e polimorfonucleares) no interstício renal intertubular da região cortical e medular, observadas em outros estudos (PURCELL & McFERRAN, 1972; POHL, 1974; SILLER & CUMMING, 1974; MACDONALD & McMARTIN, 1976; CHONG & APOSTOLOV, 1982), não foram encontradas em nenhum dos cortes renais estudados (aves GN e SPF - ambas amostras).

Nos baços, hipertrofiados ou não, das aves GN e SPF infectadas (208 e 29-78) foram encontrados centros linfóides germinativos, aumento da vascularização e da massa de tecido linfóide, caracterizando uma provável linfopose, uma vez que ocorreram durante a fase imune das aves e não foram encontrados nos baços das aves GN controles. Alguns au

tores (THORBECKE et alii, 1957; ANDERSON, 1973) atribuíram a ausência de centros linfóides germinativos no baço, a uma verdadeira condição gnotobiótica das aves. A presença desses centros linfóides germinativos nas tonsilas cecais de todas as aves GN controles e em alguns brônquios secundários de uma dessas aves, talvez seja explicável pelo fato de que a ração utilizada possuiu muitos antígenos solúveis, os quais provavelmente foram absorvidos, porque as aves GN possuem uma maior capacidade de absorver passivamente nutrientes do alimento e conseqüentemente esses antígenos solúveis (PLEASANTS, 1977).

A bursa de Fabricius foi minuciosamente estudada, principalmente os cortes provenientes de órgãos hipertrofiados e levemente congestos (aves GN e SPF - ambas amostras). Nesses cortes histológicos, foi encontrado um aumento na vascularização, um maior aglomeramento de células nos folículos (células mononucleares), formação de novos folículos e como no baço, foram encontrados durante a fase imune das aves infectadas, mas não na bursa de Fabricius das aves GN e SPF controles. Esses achados caracterizaram uma provável linfopoese. No presente estudo, não foi encontrada diminuição na linfopoese e aumento da degeneração cística, observados em outro estudo (MACDONALD & McMARTIN, 1976). As formações císticas no epitélio interno da bursa de Fabricius foram encontradas tanto nas aves GN e SPF, infectadas (ambas amostras) e controles, sendo normalmente encontradas nessa parte desse órgão (PAYNE, 1971; HODGES, 1974).

Áreas focais de tecido linfóide, com ou sem centros linfóides germinativos, foram encontradas frequentemente nos rins, glândulas de Harder, testículos e ovário das aves GN e SPF infectadas com ambas amostras, durante a fase imune dessas aves. Foram encontrados nos cortes desses órgãos nas aves SPF controles, mas não nas aves GN controles. Foram considerados como normais com base nas informações de PAYNE (1971).

Histologicamente, os ovidutos não foram estudados

porque em outro estudo (CRINION et alii, 1971b), os achados histológicos só foram encontrados em ovidutos com alterações macroscópicas (ovidutos císticos), as quais não foram encontradas em nenhuma fêmea GN e SPF, infectada (ambas amostras) ou controle.

A conjuntiva ocular e a região nasal (cornetos e seios nasais infraorbitários) não foram estudados pela histologia e imunofluorescência. Histologicamente, também não foram estudadas nos trabalhos consultados. No presente estudo, a conjuntiva ocular foi usada como via de infecção para se tentar encontrar alguma lesão causada pelo vírus da BIG nas glândulas de Harder, o que não foi encontrado (aves GN e SPF - ambas amostras). Não foram feitos cortes histológicos da região nasal, por causa da necessidade de descalcificação. Provavelmente, as lesões microscópicas nessa área devem ter sido semelhantes às encontradas na traquéia e brônquios, por causa do seu aspecto histológico normal (HODGES, 1974) e dos sintomas clínicos e lesões e achados macroscópicos, os quais comprovaram o envolvimento dessa área por ambas amostras, tanto nas aves GN como SPF.

Principalmente nas aves GN infectadas com amostras 208 e 29-78, os achados e lesões histológicas sempre estiveram associadas à presença de células infectadas com o vírus da BIG, detectadas pela imunofluorescência (Tabela I). As células superficiais do epitélio traqueal foram as primeiras a apresentarem fluorescência específica desse vírus, 24 horas antes das mesmas células a nível dos brônquios primários e secundários, provavelmente porque a infecção foi descendente. Houve um maior envolvimento das células superficiais, mesmo na fase de regeneração epitelial, e menor das células mais profundas, nas quais o vírus possivelmente estava fagocitado. Aparentemente, à medida que as células da superfície epitelial foram sendo infectadas, gradativamente descamaram, o que pôde ser observado pela intensa fluorescência detectada nas células e resíduos celulares presentes na luz bronquial e traqueal. Não foram detectadas células

com fluorescência nos centros linfóides germinativos presentes nos brônquios e na traquéia, comprovando a não predileção das amostras estudadas (208 e 29-78) por células do tecido linfóide.

Não foram encontradas diferenças entre as amostras quanto ao envolvimento de áreas e células detectadas pela imunofluorescência, tanto nas aves GN como SPF.

Células infectadas com o vírus da BIG não foram detectadas pela imunofluorescência nos sacos aéreos torácicos posteriores e abdominais, rins, baço, tonsilas cecais, glândulas de Harder, ovário, testículos e bursa de Fabricius das aves GN e SPF infectadas com amostras 208 e 29-78. Ficou comprovado o não envolvimento direto das amostras estudadas, nos achados macro e microscópicos do baço e bursa de Fabricius, os quais, provavelmente, foram provenientes de uma resposta imunitária e não inflamatória (Aves GN e SPF - ambas amostras).

A imunofluorescência indireta foi usada no presente estudo por ser mais eficiente e sensível do que o método direto em detectar menores agrupamentos e concentrações víricas intracelulares (JONES, 1974; TALEPOROS & ORNSTEIN, 1976). Sua função foi comprovar a etiologia vírica e o grau de envolvimento das amostras 208 e 29-78 nos achados macro e microscópicos.

Como as amostras estudadas somente infectaram e lesaram células epiteliais do sistema respiratório das aves GN e SPF, as amostras 208 e 29-78 foram classificadas como epiteliotrópicas, além de possuírem tropismo para o sistema respiratório dessas aves.

Um dos motivos pelos quais as aves GN e SPF foram infectadas pela via oral (ambas amostras), foi porque tem sido questionado se o vírus da BIG se multiplica ou não no trato intestinal, particularmente nas tonsilas cecais (ALEXANDER & GOUGH, 1977). Em outro estudo (ALEXANDER et alii, 1978), o vírus foi isolado das tonsilas cecais de aves infectadas com amostra nefrotrópica. Provavelmente, o vírus ao ser eli

minado dos rins lesados, pelos ureteres, pode ter atingido as tonsilas cecais, sem no entanto multiplicar nesses órgãos. No presente estudo, células infectadas com o vírus da BIG não foram detectadas pela imunofluorescência nesses órgãos (aves GN e SPF - ambas amostras), o que aconteceu também em outro estudo nesse sentido (CHONG & APOSTOLOV, 1982).

Anticorpos precipitantes anti-vírus da BIG e a presença de infiltração de células mononucleares nas áreas afetadas, indicaram uma adequada resposta imunitária e inflamatória nas aves GN e SPF infectadas com amostras 208 e 29-73.

As condições sanitárias e de manejo das aves GN e SPF infectadas (ambas amostras) e controles foram as melhores possíveis, de forma a manter a qualidade das aves inalterada e livres de "stress", durante todo o experimento. Um animal com "stress" tem um permanente aumento do nível sanguíneo de corticosteróides com conseqüente queda na resistência por inibição da reação inflamatória e da resposta imunitária (MIMS, 1977), o que provavelmente não ocorreu nas aves GN e SPF infectadas (208 e 29-78), mesmo durante a fase de doença respiratória.

Não ficou demonstrada susceptibilidade individual maior ou menor entre aves de um mesmo grupo ou de grupos diferentes (GN ou SPF), frente às amostras estudadas, inclusive com relação ao sexo das aves (Tabela I).

Foram encontradas algumas diferenças entre as amostras 208 e 29-78, ainda que mínimas, graças às aves gnotobióticas, ao contrário das aves SPF, nas quais uma provável infecção bacteriana secundária igualou os resultados e achados de ambas amostras. Computando todos os resultados nas aves GN, a amostra 208 foi um pouco mais virulenta do que a amostra 29-78.

As amostras com tropismo para o sistema respiratório isoladas e estudadas nos trabalhos consultados, assim como as amostras 208 e 29-78, são menos virulentas, por si só, do que as amostras nefrotrópicas. Entretanto, o problema do vírus da BIG, principalmente dessas amostras com tro-

pismo para o sistema respiratório, sempre foi o envolvimento comprovado de bactérias e fungos potencialmente patogênicos em uma infecção secundária ao vírus e a associação sinérgica com outros patógenos (*Mycoplasma gallisepticum*; *Mycoplasma synoviae*; *Escherichia coli*; *Haemophilus gallinarum*; vírus da laringotraqueíte e adenovírus) (ADLER et alii, 1962; SPRINGER et alii, 1974; HOFSTAD, 1978) em aves de criação industrial, as quais também convivem com um constante "stress" e outros vírus imunodepressores (HOFSTAD, 1978). Esses fatores modificam completamente o quadro de uma infecção pelo vírus da BIG, mesmo quando se trata de amostras pouco virulentas como a 208 e 29-78.

As amostras 208 e 29-78, assim como as amostras de vírus da BIG isoladas antes do início da vacinação contra a BIG no Brasil, precisam ser estudadas, como por exemplo, nas diversas faixas etárias das aves reprodutoras, uma vez que isso é necessário para uma melhor avaliação da importância dessas amostras no complexo das doenças respiratórias e reprodutoras, que tanto afligem a avicultura industrial no Brasil.

Outro estudo que deve ser feito é a avaliação da atual vacina empregada no Brasil visando o controle da BIG. Não se sabe até o presente momento se a vacinação indiscriminada com vírus vivo atenuado (amostra Holland-H-120) tem realmente colaborado no controle da BIG ou se tem agravado o problema, passando a ser mais um vírus participante do complexo das doenças respiratórias que afeta a avicultura industrial do país. A amostra H-120, embora atenuada, pode lesionar o epitélio do sistema respiratório (MACDONALD & McMARTIN, 1976) e provavelmente, na presença daqueles agentes e fatores anteriormente mencionados, pode causar uma doença respiratória grave.

CONCLUSÕES

- a - As amostras 208 e 29-78 infectaram aves GN e SPF, desencadeando sintomas clínicos de doença respiratória, caracterizada por espirros (aves GN e SPF) e dificuldade respiratória (aves SPF), em 100% das aves inoculadas.
- b - Nas aves GN, as amostras provocaram sintomas clínicos diferentes. A amostra 208 causou uma doença respiratória mais grave, com período de incubação mais curto e curso mais longo.
- c - A doença respiratória das aves SPF foi mais grave do que a das aves GN (ambas amostras), possivelmente devido à presença de infecção bacteriana secundária.
- d - Os achados de necropsia foram: congestão dos cornetos e seios nasais infraorbitários, traqueíte discreta e conjuntivite, além da presença de exsudato na região nasal e traquéia.
- e - Histologicamente, causaram descamação e hiperplasia epitelial, seguida de infiltração de células mononucleares no epitélio traqueal e bronquial.
- f - Células infectadas com o vírus da BIG foram detectadas, pela imunofluorescência, na traquéia e brônquios.

- g - Nenhum achado macro e microscópico, bem como células com fluorescência específica desse vírus, foram encontrados fora do sistema respiratório.
- h - No presente estudo, ficou comprovado que as amostras 208 e 29-78 podem causar problemas respiratórios em aves, mesmo sem a interferência de bactérias colonizadoras do sistema respiratório.
- i - As duas amostras foram essencialmente epiteliotrópicas e possuíram tropismo para o sistema respiratório. As aves gnotobióticas forneceram informação valiosa no estudo da patogenia das amostras 208 e 29-78 do vírus da BIG.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADLER, H.E.; McMARTIN, D.A.; ORTMAYER, H. The effect of infectious bronchitis virus on chickens infected with *Mycoplasma gallisepticum*. *Avian Dis.*, College Station, 6(3):267-74, 1962.
- ALEXANDER, D.J. & GOUGH, R.E. Isolation of infectious bronchitis virus from experimentally infected chickens. *Res. Vet. Sci.*, London, 23(3):344-7, 1977.
- ALEXANDER, D.J.; GOUGH, R.E.; PATTISON, M. A long-term study of the pathogenesis of infection of chickens with three strains of infectious bronchitis virus. *Res. Vet. Sci.*, London, 24(2):228-33, 1978.
- ANDERSON, J.C. The induction of germinal centres in germ-free chickens. *J. Pathol.*, Edimburg, 109(3):251-7, 1973.
- BEAUDETTE, F.R. & HUDSON, C.B. Cultivation of the virus of infectious bronchitis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, Schaumburg, 90(2):51-60, 1937.
- BRADLEY, R.E.; BOTERO, H.; JOHNSON, J.; REID, W.M. Techniques in parasitology. I. Gnotobiotic poultry in plastic film isolator and some applications to parasitological research. *Exp. Parasitol.*, New York, 21(3):403-13, 1967.
- BRASIL. Leis, decretos, etc. Portaria n.24 - 17 jan. 1980. Vacinas; aprova normas a serem observadas na produção, controle e emprego de vacina contra a bronquite infecciosa. São Paulo, Lex Editora, 1980. 6p.

- BROADFOOT, D.I. & SMITH, W.M. Effects of infectious bronchitis virus in laying hens on egg production, percent unsettingtable eggs and hatchability. *Poult. Sci.*, Menasha 33(3):653-4, 1954.
- CHERRY, W.B. Immunofluorescence Techniques. In: LENNETTE, E.H.; SPAULDING, E.H.; TRUANT, J.P., eds. *Manual of clinical microbiology*. 2.ed. Washington, American Society for Microbiology, 1974. p. 29-44.
- CHONG, K.T. & APOSTOLOV, K. The pathogenesis of nephritis in chickens induced by infectious bronchitis virus. *J. Comp. Pathol.*, London, 92(2):199-211, 1982.
- COOK, J.K.A. Duration of experimental infectious bronchitis in chickens. *Res. Vet. Sci.*, London, 9(6):506-12, 1968.
- CRINION, R.A.P.; BALL, R.A.; HOFSTAD, M.S. Abnormalities in laying chickens following exposure to infectious bronchitis virus at one day old. *Avian Dis.*, College Station, 15(1):42-8, 1971a.
- CRINION, R.A.P.; BALL, R.A.; HOFSTAD, M.S. Pathogenesis of oviduct lesions in immature chickens following exposure to infectious bronchitis virus at one day old. *Avian Dis.*, College Station, 15(1):32-41, 1971b.
- CRINION, R.A.P. & HOFSTAD, M.S. Pathogenicity of four serotypes of avian infectious bronchitis virus for the oviduct of young chickens of various ages. *Avian Dis.*, College Station, 16(2):351-62, 1972.
- CUNNINGHAM, C.H. & STUART, H.O. Cultivation of the virus of infectious bronchitis of chickens in embryonated chickens eggs. *Am. J. Vet. Res.*, Chicago, 8(27):209-12, 1947.
- CUNNINGHAM, C.H. *A laboratory guide in virology*. 7.ed. Minneapolis, Burgess, 1973. 103p.
- CUMMING, R.B. Infectious avian nephrosis (uraemia) in Australia. *Aust. Vet. J.*, Sidney, 39(4):145-7, 1963.
- DELAPLANE, J.P. & STUART, H.O. Studies on infectious bronchitis. *Bull. Rhode I. Agric. Exp. Sta.*, Providence, 273:18-33, 1939.

- FORBES, M. & PARK, J.T. Growth of germ-free and conventional chicks: effect of diet, dietary penicillin and bacterial environment. *J. Nut.*, Bethesda, 67:69-84, 1959.
- FIESER, L.F. & FIESER, M. *Reagents for organic synthesis*. New York, John Wiley & Sons, 1967. 459p.
- FREEMAN, B.M. Body temperature and thermoregulation. In: BELL, D.J. & FREEMAN, B.M., eds. *Physiology and biochemistry of the domestic fowl*. London, Academic Press, 1971. v.2, p. 1115-51.
- GARSIDE, J.S. The histopathological diagnosis of avian respiratory infections. *Vet. Rec.*, London, 77(13):354-66, 1965.
- GOUFFAUX, M.; VINDEVOGEL, H.; MEULEMANS, G.; DEWAELE, A.; HALEN, P. Elements du diagnostic histopathologique différentiel des principales affections respiratoires de la poule. *Avian Pathol.*, Cambridge, 6(1):61-76, 1977.
- HERBERT, G.A. Ammonium sulphate fractionation of sera: mouse, hamster, guinea pig, monkey, chimpanzee, swine, chicken and cattle. *Appl. Microbiol.*, Washington, 27(3): 389-93, 1974a.
- HERBERT, W.J. Mineral-oil adjuvants and the immunization of laboratory animal. In: WEIR, D.M., ed. *Handbook of experimental immunology*. 2.ed. Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1974b. v.3, appendix 2-3.
- HEREDIA, S.A.M.; OLIVEIRA, R.L.; LOPES, Z.M.A. Ocorrência de anticorpos neutralizantes contra o vírus da bronquite infecciosa em aves procedentes dos plantéis de reprodução em Minas Gerais. In: CONGRESSO MUNDIAL DE AVICULTURA, 16º, Rio de Janeiro, 1978. *Anais*. Rio de Janeiro, 1978. v. 3, p. 395-405.
- HIPOLITO, O. Isolamento e identificação do vírus da bronquite infecciosa das galinhas no Brasil. *Arq. Esc. Sup. Vet. UREM*G, Belo Horizonte, 10:131-50, 1957.
- HIPOLITO, O.; GODOY, A.M.; MUTH, H. Avian infectious bronchitis in Brazil. *Arq. Esc. Vet. UFMG*, Belo Horizonte, 13:57-9, 1960/61.

- HIPOLITO, O. & GODOY, A.M. Estudos sobre a bronquite infecciosa no Brasil. II. Disseminação da doença em alguns estados. *Arq. Esc. Vet. UFMG*, Belo Horizonte, 15:323-6, 1963.
- HIPOLITO, O.; BOTTINO, J.A.; PINTO, A.A. Estudo de duas amostras de vírus isoladas de casos de aves com a "Síndrome nefrite-nefrose". *Cienc. Cult.*, São Paulo, 25(6):609, 1973.
- HODGES, R.D. *The histology of the fowl*. New York, Academic Press, 1974. 648p.
- HOFSTAD, M.S. A study of infectious bronchitis in chickens. I. The pathology of infectious bronchitis. *Cornell Vet.*, Ithaca, 35(1):22-31, 1945.
- HOFSTAD, M.S. Antigenic differences among isolates of infectious bronchitis virus. *Am. J. Vet. Res.*, Chicago, 36(4):524-6, 1975.
- HOFSTAD, M.S. Avian infectious bronchitis. In: HOFSTAD, M. S.; CALNEK, B.W.; HEMBOLDT, C.F. REID, W.M.; YODER, H.W., eds. *Diseases of poultry*. 7.ed., Ames, Iowa State University Press, 1978. p. 487-503.
- HSIUNG, H.M., HIPOLITO, O.; SILVA, E.N. Levantamento sorológico da bronquite infecciosa das galinhas. In: CONGRESSO MUNDIAL DE AVICULTURA, 16º, Rio de Janeiro, 1978. *Anais*. Rio de Janeiro, 1978. v.5, p. 707-12.
- JONES, R.C. & JORDAN, F.T.W. Persistence of virus in the tissues and development of the oviduct in the fowl following infection at day old with infectious bronchitis virus. *Res. Vet. Sci.*, London, 13(1):52-60, 1972.
- JONES, R.C. Nephrosis in laying chickens caused by Massachusetts-type infectious bronchitis virus. *Vet. Rec.* London, 95(14):319, 1974.
- JONES, R.C. Use of the indirect fluorescent antibody method for detecting antibodies to infectious bronchitis virus in chicken serum. *J. Comp. Pathol.*, London, 85(3):473-79, 1975.

- JULIAN, R.J. & WILLIS, N.G. The nephrosis-nephritis syndrome in chickens caused by Holte strain of infectious bronchitis virus. *Canad. Vet. J.*, Ottawa, 10:18-20, 1969.
- JUNQUEIRA, L.C. & CARNEIRO, J. *Histologia básica*. 2.ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1971. 440p.
- LOOMIS, L.N.; CUNNINGHAM, C.H.; GRAY, M.L.; THORP, F. Pathology of the chicken embryo infected with infectious bronchitis virus. *Am. J. Vet. Res.*, Chicago, 40(9):245-51, 1950.
- LUCAS, A.M. & JAMROZ, C. *Atlas of avian hematology*. Washington Department of Agriculture, 1961. 271p.
- MACDONALD, J.W. & McMARTIN, D.A. Observations on the effects of the H52 and H120 vaccine strains of infectious bronchitis virus in the domestic fowl. *Avian Pathol.*, Cambridge, 5(3):157-73, 1976.
- MACDONALD, J.W.; RANDALL, C.J.; McMARTIN, D.A. An inverse age resistance of chickens kidneys to infectious bronchitis virus. *Avian Pathol.*, Cambridge, 9(3):245-59, 1980.
- MACDONALD, J.W.; RANDAL, C.J.; McMARTIN, D.A.; DAGESS, M.D.; GADZINSKI, P. Active and passive immunization against nephritis induced by an avian infectious bronchitis virus. *Avian Pathol.*, Cambridge, 10(2):121-9, 1981.
- MACHADO, A.V. *The effect of infectious bronchitis and newcastle disease on the blood cells of chickens*. Ithaca, Cornell University, 1951. 106p. (Tese, M.S.).
- MATTHEWS, R.E.F. Classification and nomenclature of viruses. Fourth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Intervirology*, Basel, 17(1/3):1-200, 1982.
- McDEVITT, H.O.; PETERS, J.H.; POLLARD, L.W.; HARTER, J.G.; COONS, A.H. Purification and analysis of fluorescein-labeled antisera by column chromatography. *J. Immunol.*, Baltimore, 90(4):634-42, 1963.
- McMARTIN, D.A. The pathogenicity of an infectious bronchitis virus for laying hens, with observations on pathogenesis. *Br. Vet. J.*, London, 124(12):576-80, 1968.

- MIMS, C.A. *The pathogenesis of infectious diseases*. 2.ed. London, Academic Press, 1977. 246 p.
- PAGE, C.A. & CUNNINGHAM, C.H. The neutralization test for infectious bronchitis virus. *Am. J. Vet. Res.*, Chicago, 23 (93):1065-71, 1962.
- PARISIS, E. The diagnosis of infectious bronchitis in fowls. II. Studies on the production of antigen for the gel precipitin test. *Brit. Vet. J.*, London, 121(5):234-9, 1965.
- PAYNE, L.N. The lymphoid system. In: BELL, D.J. & FREEMAN, B.M., eds. *Physiology and biochemistry of the domestic fowl*. London Academic Press, 1971. v.2, p. 985-1037.
- PLEASANTS, J.R. Gnotobiotic. In: MELBY, E.C. & ALTMAN, N. H., eds. *Handbook of laboratory animal science*. 2.ed. Cleveland, CRC Press, 1977, v.1, p. 119-174.
- POHL, R.T. The histopathogenesis of the nephrosis-nephritis syndrome. *Avian Pathol.*, Cambridge, 3(1):1-13, 1974.
- PRINCE, R.P.; POTTER, L.M.; LUGINBUHL, R.E.; CHOMIAK, T. Effect of ventilation rate on the performance of chicks inoculated with infectious bronchitis virus. *Poult. Sci.*, Menasha, 41(1):268-71, 1962.
- PURCELL, D.A. & McFERRAN, J.B. The histopathology of infectious bronchitis in the domestic fowl. *Res. Vet. Sci.*, London, 13(92):116-22, 1972.
- PURCELL, D.A.; THAM, V.L.; SURMAN, P.G. The histopathology of infectious bronchitis in fowls infected with a nephrotropic T strain of virus. *Aust. Vet. J.*, Sydney, 52(2):82-91, 1976.
- REED, L.J. & MUNCHEN, H.A. A simple method of estimation fifty per cent endpoints. *Am. J. Hyg.*, Baltimore, 27(3): 493-7, 1938.
- REIS, J. & NOBREGA, P. Bronquite infecciosa. In: REIS, J. & NOBREGA, P., eds. *Tratado de doenças das aves*. 2.ed., São Paulo, Melhoramentos, 1956. v.1, p. 155-67.
- SANDERS, B.J. Animal histology techniques. In: MELBY, E.C. & ALTMAN, N.H., eds. *Handbook of laboratory animal science*. 2.ed. Cleveland, CRC Press, 1977. v.2. p. 119-91.

- SEVOIAN, M. & LEVINE, P.P. Effects of infectious bronchitis on the reproductive tracts, egg production and egg quality of laying chickens. *Avian Dis.*, College Station, 1(2): 136-64, 1957.
- SILLER, W.G. & CUMMING, R.B. The Histopathology of an interstitial nephritis in the fowl produced experimentally with infectious bronchitis virus. *J. Pathol.*, Edimburgh, 114(3):163-73, 1974.
- SILVA, J.M.L.; HSIUNG, H.M.; CESARO, A.J. Aspectos clínicos e anátomo-patológicos da síndrome nefrite-nefrose (SNN) em frangos de corte. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE AVICULTURA, 69, Belo Horizonte, 1979. *Anais*. Belo Horizonte, 1979. v.3, p. 414-22.
- SINGH, V.P. & MALIK, B.S. Concentration of infectious bronchitis virus antigen in chickens embryos for agar gel diffusion technique. *Indian J. Anim. Health*, Calcuta, 13(3):71-2, 1974.
- SPRINGER, W.T.; LUSKUS, C.; POURCIAU, S.S. Infectious bronchitis and mixed infections of *Mycoplasma synoviae* and *Escherichia coli* in gnotobiotic chickens. I. Synergistic role in the airsacculitis syndrome. *Infect. Immun.*, Washington, 10(3):578-89, 1974.
- TALEPOROS, P. & ORNSTEIN, L. Histological methods. In: WILLIAMS, C.A. & CHASE, M.W., eds. *Methods in immunology and immunochemistry*. London, Academic Press, 1976. v.5, p. 375-456.
- THORBECKE, G.J.; GORDON, H.A.; WOSTMAN, B.; WAGNER, M.; REYNIERS, J.A. Lymphoid tissue and serum gammaglobulin in young germ-free chickens. *J. Infect. Dis.*, Chicago, 101(2): 237-51, 1957.
- WINTERFIELD, R.W. & HITCHNER, S.B. Etiology of an infectious nephritis-nephrosis syndrome of chickens. *Am. J. Vet. Res.*, Chicago, 23(97):1273-9, 1962.
- WINTERFIELD, R.W.; FADLY, A.M.; HOERR, F.J. Immunity to infectious bronchitis virus from spray vaccination with

derivates of a Holland strain. *Avian Dis.*, College Station,
20(1):42-8, 1975.