

ESTUDO DO CICLO DE REPLICAÇÃO DO VÍRUS DA DOENÇA INFECCIOSA DA BURSA NA LINHAGEM CELULAR RK-13

C.E. Marinho*, M.J.B. Fernandes, I.C. Simoni

Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal, Instituto Biológico, CP 12898, CEP 04010-9702, São Paulo, SP, Brasil. E-mail: simoni@biologico.br

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi estudar o ciclo de replicação do vírus da doença infecciosa da bursa (IBDV) na linhagem celular RK-13 através da presença de efeito citopático, título viral e detecção do RNA viral pela eletroforese em gel de poliacrilamida. Utilizou-se uma amostra de campo (BAB) e a vacina GBV. Os títulos dos vírus extracelulares foram mais altos do que os títulos dos vírus intracelulares para ambas amostras e foram detectados, primeiramente, 6 horas pós-inoculação (pi), enquanto os vírus intracelulares foram detectados 10 horas pi. O aparecimento do efeito citopático começou as 10 horas pi para a amostra BAB e 24 horas pi para GBV-8 concomitante a detecção do RNA viral pela eletroforese. O ciclo de replicação na linhagem RK-13 quando comparado com dados da literatura mostra que apesar de ser mais lento do que na cultura primária de embrião de galinha foi igual ou mais rápido do que o observado em outras linhagens celulares.

PALAVRAS-CHAVE: Vírus da doença infecciosa da bursa, ciclo de replicação, linhagem celular RK-13.

ABSTRACT

STUDY OF REPLICATION CYCLE OF INFECTIOUS BURSAL DISEASE VIRUS IN RK-13 CELL LINE. The aim of the present work was to study the replication cycle of infectious bursal disease virus (IBDV) in RK-13 cell line through presenting of cytopathic effect, viral titration and detection of viral RNA by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). One field sample (BAB sample) and the vaccine strain GBV were used. The detection of extra-cellular viruses occurred before that of intra-cellular viruses, at 6 and 10 hours post-inoculation (pi) respectively. The extra-cellular viral titers were higher than intra-cellular viral titers for both samples. The cytopathic effect began at 10 hours pi for the BAB sample and 24 hours pi for the GBV sample together with the detection of viral RNA by PAGE. Comparing with literature data the replication cycle in RK-13 cell line was slower than in primary chicken embryo fibroblast cultures but equal to or faster than that in other cell lines.

KEY WORDS: Infectious Bursal Disease Virus, replication cycle, RK-13 cell line.

INTRODUÇÃO

A doença infecciosa da bursa (DIB) também denominada doença de Gumboro causa uma infecção aguda em galinhas jovens e tem o tecido linfóide como alvo primário com especial predileção pela Bolsa de Fabrício. A doença manifesta-se como imunossupressão ou em sua forma clínica dependendo da idade das aves. O vírus replica-se, principalmente, nos linfócitos B imaturos, causando uma severa inflamação e atrofia da bursa (LUKERT & SAIF, 1991; OJEDA *et al.*, 1997).

O vírus da DIB ou IBDV (Infectious Bursal Disease Virus), é um membro da família Birnaviridae, consti-

tuído por partículas virais sem envoltório, capsídeo icosaédrico de aproximadamente 60nm de diâmetro e genoma com dois segmentos de fita dupla (ds) de RNA (MURPHY *et al.*, 1995). Existem dois sorotipos e somente o sorotipo 1 é patogênico em galinhas (MACFERRAN *et al.*, 1980).

O método tradicional de isolamento do vírus é feito em membranas corioalantóides de embriões de galinha de 9 a 11 dias de idade (LUKERT & SAIF, 1991). O isolamento e a propagação do IBDV *in vitro* é muito difícil e trabalhoso, geralmente empregam-se culturas celulares primárias de embrião de galinha de 9 a 11 dias de idade. Nessas culturas o vírus produz efeito citopático característico, que se

*Bolsista do CNPq/PIBIC/IB

apresenta como degeneração e arredondamento das células. Alguns trabalhos relatam a utilização de linhagens celulares contínuas de mamíferos para a replicação do IBDV (JACKWOOD *et al.*, 1987; COWEN *et al.*, 1988, FREDERIC *et al.*, 1992). Em trabalho anterior (SIMONI *et al.*, 1998) foi estudado a suscetibilidade de diversas linhagens celulares de mamíferos e uma de aves, à amostras de IBDV vacinais e de campo e comparação com a cultura primária de fibroblasto de embrião de galinha (CEF) O IBDV se replicou em todas células de mamíferos sendo que a linhagem celular RK-13 foi a que apresentou efeito citopático (ECP) mais pronunciado e semelhante ao ECP verificado em cultura primária. Dessa maneira, esta linhagem foi escolhida pelo nosso laboratório para pesquisa de IBDV em estudos de isolamento e propagação.

Com o intuito de aprofundar os estudos nesta linhagem, este trabalho teve como objetivo estudar o ciclo de replicação do vírus da doença infecciosa da bursa (IBDV) na linhagem celular RK-13, a partir de uma amostra de campo (BAB) e da vacina GBV, produzida e cedida gentilmente pelo Laboratório Biovet, através da presença de efeito citopático (ECP), título viral e detecção do RNA viral pela eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE).

MATERIAL E MÉTODOS

Cultura celular

Linhagem celular contínua de rim de coelho, RK-13, mantida em Meio Eagle Mínimo (MEM) em sais de Earle da Cultilab® Ltda, acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB).

Amostras virais

Amostra GBV: Amostra vacinal de IBDV gentilmente cedida pelo Laboratório BIOVET e propagada em cultura primária de embrião de galinha (CEF) por seis passagens e em seguida na linhagem RK-13 por duas passagens, com efeito, citopático (ECP) observado desde a 1ª passagem. O título viral foi de $10^{5.33}$ DICC₅₀/50mL.

Amostra BAB: Amostra de campo obtida a partir de um *pool* de bursas de aves com 45 dias de uma granja de postura comercial da região de Bastos. O *pool* de bursas foi macerado, diluído em solução salina de Hanks com antibióticos (penicilina e estreptomicina) e centrifugado durante 15 minutos a 2500 x g. O sobrenadante foi coletado e filtrado em membrana com porosidade de 0,45nm (SIMONI, 2001) e feita a propagação diretamente na linhagem RK-13 sem prévia adaptação em CEF, até a 6ª passagem sendo que a partir da 4ª passagem houve aparecimento de ECP. O título viral foi de $10^{4.91}$ DICC₅₀/50mL.

Ciclo de replicação viral

Frascos de 25 cm² contendo 3×10^5 células/mL foram inoculados com 0,2 mL de suspensão viral (amostra GBV e BAB) e incubados a 37° C em estufa de CO₂. Em intervalos de 6, 10, 24, 32, 48, 56 e 72 h, os sobrenadantes foram coletados (vírus extracelulares) e depois as células foram lavadas, raspadas dos frascos e coletadas por centrifugação a 2.500 x g/10 min. (vírus intracelulares). Os vírus extra e intracelulares foram titulados utilizando-se de microplacas de 96 cavidades. O título viral foi calculado através da Dose Infectante de Cultura de Células 50% (DICT₅₀) pelo método de REED & MUENCH (1938).

Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE)

A extração do RNA viral foi feita com TRIzol (Gibco BRL)/clorofórmio com prévio tratamento da amostras com SDS 1% e posterior precipitação com etanol/NaCl (SIMONI, 2001). A eletroforese em gel de poliacrilamida a 7,5% foi feita a 10 mA por 23 horas a 4° C e os segmentos de RNA foram visualizados pelo método de coloração com Nitrato de prata (HERRING *et al.*, 1982). O reovírus S1133 foi utilizado como controle. Foi feita uma alteração no método acima com a adição de proteinase K ao SDS antes da fase de extração, numa concentração final de 100 mg/mL e também aumento no período e temperatura de incubação nesta fase, de 37° C/30 min. para 60° C/2 horas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Baseado em trabalhos que mostram que as curvas de crescimento de IBDV em culturas primárias de embrião de galinha (CEF) e em linhagens celulares são similares (JACKWOOD *et al.*, 1987), e também através de nossos estudos de suscetibilidade (SIMONI *et al.*, 1998) e testes de vírus neutralização (SIMONI, 2001) que mostraram que as células CEF e RK-13 apresentaram comportamento similares, este trabalho não realizou uma comparação entre estas células, mas uma comparação entre amostras de IBDV, de campo (BAB) e vacinal (GBV) na linhagem RK-13, utilizada por este laboratório para pesquisa de IBDV.

Os vírus extracelulares foram detectados às 6 horas após inoculação (pi), primeiramente, aos vírus intracelulares (10 horas pi) para ambas amostras, BAB e GBV (Tabela 1 e 2, respectivamente). COWEN & BRAUNE (1988) utilizando a amostra vacinal D78 em linhagem QT35 detectou os vírus extra e intracelulares às 12 horas pi. PETEK *et al.* (1973) relatam o início às 4 hpi, utilizando uma amostra vacinal em culturas primárias de embrião de galinha (CEF). Em LUKERT & DAVIS (1974) com uma cepa de IBDV em cultura primária de rim de embrião de galinha (CEK), o aparecimento dos vírus ocorreu entre 9 e 12 horas pi. JACKWOOD *et*

Tabela 1 - Propagação da amostra BAB na linhagem celular RK-13.

	6 hpi	10 hpi	24 hpi	32 hpi	48 hpi	56 hpi	72 hpi
Vírus intracelular	0	2,22	2,83	2,72	2,66	3,50	3,50
Vírus extracelular	1,50*	1,66	3,22	3,00	3,50	3,50	3,50
ECP	-	+	++	++	+++	++++	++++
PAGE ^a	-	+	+	+	+	+	+

hpi: horas após inoculação

ECP: efeito citopático; + 25%; ++ 50%; +++ 75%; ++++ 100%

PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida; + identificação das duas bandas do IBDV; - não apresentou bandas.

*: \log_{10} título viral (DICC₅₀)

a: vírus extracelular

Tabela 2 - Propagação da amostra GBV na linhagem celular RK-13.

	6 hpi	10 hpi	24 hpi	32 hpi	48 hpi	56 hpi	72 hpi
Vírus intracelular	0	1,00	1,50	2,00	2,22	2,50	2,50
Vírus extracelular	0,74*	1,33	2,00	2,33	3,00	2,66	2,50
ECP	-	-	+	+	++	+++	++++
PAGE ^a	-	-	+	+	+	+	+

hpi: horas após inoculação

ECP: efeito citopático; + 25%; ++ 50%; +++ 75%; ++++ 100%

PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida; - não apresentou bandas; + identificação das duas bandas do IBDV

*: \log_{10} título viral (DICC₅₀)

a: vírus extracelular

al. (1987) detectaram vírus intra e extracelular a 2 e 4 horas pi respectivamente utilizando células CEF e 4 horas pi utilizando a linhagem BGM-70. Como o período de latência do IBDV é de 4-6 horas pi (JACKWOOD *et al.*, 1987; LUKERT&SAIF, 1997) e como a nossa coleta foi feita a partir das 6 horas pi, não está descartado a presença de vírus às 4 horas pi.

Apesar dos títulos dos vírus extracelulares ($10^{1.5}$ /BAB e $10^{0.74}$ /GBV) serem menores inicialmente do que os dos vírus intracelulares ($10^{2.22}$ /BAB e 10^1 /GBV), mantiveram-se mais altos durante todo o período, alcançando título máximo às 48 horas pi ($10^{3.5}$ /BAB e $10^{3.0}$ /GBV) frente às 56 horas pi para os vírus intracelulares ($10^{3.5}$ /BAB e $10^{2.5}$ /GBV). JACKWOOD *et al.* (1987) e COWEN & BRAUNE (1988) também obtiveram pico do título dos vírus extracelulares utilizando outras linhagens às 48 horas pi. Outros autores também obtiveram valores dos títulos extracelulares mais altos que os vírus intracelulares (COWEN & BRAUNE, 1988; PETEK *et al.*, 1973; JACKWOOD *et al.*, 1987).

Os valores dos títulos virais foram plotados em gráficos para obtenção das curvas de crescimento das amostras BAB (Fig. 1) e GBV (Fig. 2) que se mostraram similares entre si e às curvas típicas de IBDV em CEF e em outras linhagens (BECHT, 1981). O ciclo de replicação na linhagem RK-13 foi de 48 horas para ambas as amostras como descrito para as linha-

gens Vero e BGM-70 (LUKERT & DAVIS, 1974) e que é mais longo do que em CEF, que é de 10-36 horas (LUKERT & SAIF, 1997).

O aparecimento do efeito citopático (ECP) também mostrado nas tabelas 1 e 2, iniciou-se às 10 horas pi para a amostra BAB e 24 horas pi para a amostra GBV, atingindo 25% das células e caracterizado pela degeneração e arredondamento celular (Fig. 3). Este efeito foi total, atingindo 100% das células, com 56 e 72 horas pi para as amostras BAB e GBV respectivamente. Assim, apesar da similaridade na curva de crescimento (tempo e título), estas amostras diferiram quanto ao ECP. A amostra de campo (BAB) teve um ECP mais rápido e total antes da amostra vacinal (GBV).

A detecção do RNA viral pela eletroforese a partir do material dos vírus extracelulares, correlacionou-se com a presença do ECP, isto é, foi positiva somente às 10 horas pi na amostra BAB e 24 horas pi na amostra GBV (Tabelas 1 e 2). O genoma do vírus pode ser separado em dois segmentos pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida como ocorre com outros vírus que apresentam genoma segmentado (JOKLIK *et al.*, 1994). Estudos verificaram que os segmentos de IBDV são firmemente ligados por uma proteína de 90 kD que circulariza o RNA viral, uma RNA polimerase denominada VP1 (AKIN *et al.*, 1998) e uma digestão ineficiente dos constituintes virais faz com que o RNA viral não se dissocie do complexo

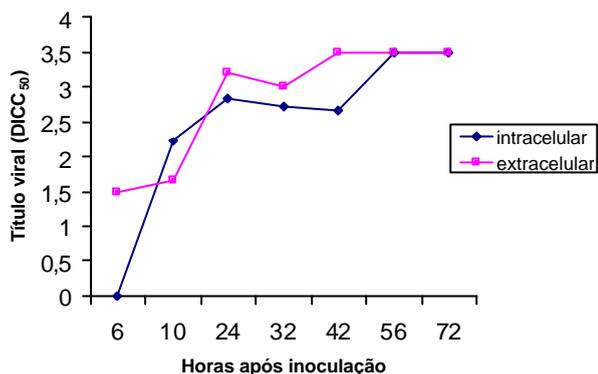


Fig. 1 - Curva de crescimento da amostra BAB na linhagem RK-13.

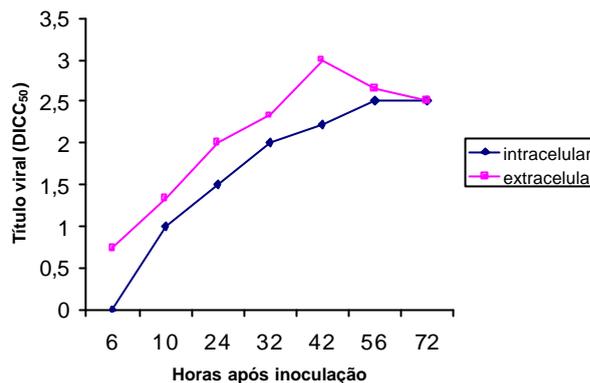


Fig. 2 - Curva de crescimento da amostra GBV na linhagem RK-13.



a



b

Fig. 3 - Linhagem celular RK-13. a: não inoculada (controle); b: inoculada com vírus da doença infecciosa da bursa (IBDV) e exibindo efeito degenerativo caracterizado por granulação, arredondamento e retração celular.

protéico durante a fase de extração do RNA e o ds RNA viral permanecendo na fase orgânica da extração é perdido. O tratamento com proteinase K hidroliza a VP1 e libera o RNA na fase aquosa da extração fenol/clorofórmio tornando este procedimento mais eficiente que o método de extração apenas com sais de tiocianato de guanidina (TRIzol). Assim neste estudo, igualmente aos resultados de AKIN *et al.* (1998), obteve-se um melhor resultado quando o material foi tratado com proteinase K adicionada a solução de SDS antes da extração fenol/clorofórmio. A positividade em eletroforese correspondeu a títulos virais de IBDV entre $10^{1,5-2,0}$, indicando que a sensibilidade desta técnica situa-se nesta faixa de títulos virais. Esta técnica é altamente específica e com boa sensibilidade, embora a sensibilidade seja mais baixa do que o RT-PCR (WINIARCZYK & GRADZKI, 1999).

CONCLUSÃO

As amostras GBV e BAB apresentaram resultados similares na curva de crescimento e na detecção dos vírus intra e extracelulares, mostrando que independente de serem vacinal ou de campo, após adaptação ao cultivo celular, comportaram-se igualmente.

Uma comparação com dados da literatura indica que o ciclo de replicação na linhagem RK-13 apesar de ser mais lento do que na cultura primária de embrião de galinha, foi igual ou mais rápido do que o observado em outras linhagens celulares.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKIN, A.; WU, C.C.; LIN, T.L. A comparison of two RNA isolation methods for double-stranded RNA of

- infection bursal disease virus. *J. Virol. Methods*, v.74, p.179-184, 1998.
- BECHT, H. Infectious bursal disease virus. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, v.90, p.107-121, 1981.
- COWEN, B.S. & BRAUNE, M.O. The propagation of avian viruses in a continuous cell line (QT35) of Japanese quail origin. *Avian Dis.*, v.32, p.282-297, 1988.
- FREDERIC, S.; KIBENGE, F.S.B.; KENNA, K.M. Isolation and propagation of Infectious bursal disease virus using the ovine kidney continuous cell line. *Avian Dis.*, v.36, p.256-261, 1992.
- HERRINGS, A.J.; NGLIS, N.F.; OEH, C.K.; SNODGRASS, D.R.; MENZIES, J.D. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. *J. Clin. Microbiol.*, v.16, p.473-477, 1982.
- JACKWOOD D.J.; SAIF Y.M.; HUGHES J.H. Replication of IBDV in continuous cell line. *Avian Dis.*, v.31, n.2, p.370-375, 1987.
- JOKLIK, W. Reoviruses. In: *Encyclopedia of virology*. WEBSTER R. & GRANOFF A. (Eds). New York: Academic Press, 1994. v.3, p.1194-1202.
- LUKERT, P.D. & DAVIS, R.B. Infectious bursal disease virus: growth and characterization in cell cultures. *Avian Dis.* v.18, p.243-250, 1974.
- LUKERT, P.D. & SAIF, Y.M. Infectious bursal disease. In: CALNAK, B.W.; H.J.; BARNES, C.W.; BEARD, W.M.; YODER, H.W (Eds.). *Disease of poultry*. 9.ed. Ames: Iowa State University Press, 1997. v.10, p. 721-738.
- OJEDA, F.; SKARDOVA, I.; GUARDA, M.I.; ULLOA, J.; FOLCH, H. Proliferation and apoptosis in infection with infectious bursal disease virus: a flow cytometric study. *Avian Dis.*, v.41, p.312-316, 1997.
- McFERRAM, J.B.; McNULTY, M.S.; McKILLOP, E.R.; CONNOR, T.J.; McCracken, R.M.; COLLINS, D.S.; ALLAN, G.M. Isolation and serological studies with IBDV from fowl, turkeys and ducks: Demonstration of a second serotype. *Avian Pathol.*, v.9, p.395-404, 1980
- MURPHY, F.A.; FAUQUET, C.M.; BISHOP, D.H.L.; GHABRIAL, S.A.; JARVIS, A.W.; MARTELLI, G.P.; MAYO, M.A.; SUMMERS, M.D. Virus Taxonomy. *Arch. Virol.*, v.140, Suppl. 10, p.240-244, 1995
- PETEK, M.; D'APRILE, P.N.; CANCELLOTTI, F. Biological and physico-chemical properties of the infectious bursal disease virus. *Avian Pathol.*, v.2, p.135-152, 1973.
- REED, J.H. & MUENCH, H. A simple method for estimating fifty percent endpoints. *Am. J. Hyg.*, v.27, p.493-496, 1938.
- SIMONI, I.C.; FERNANDES, M.J.B.; MADEIRA, AM.B.N.; ARNS, C.W. Propagation of infectious bursal disease virus in continuous cell lines. *Virus Rev. & Res.*, v.3, p.66-69, 1998.
- SIMONI, I.C. *Utilização de diferentes linhagens celulares para propagação do vírus da doença infecciosa da bursa*. São Paulo: 2001. 77p. [Tese (Doutorado) – Instituto de Biologia, Univ. Estadual de Campinas].
- WINIARCZYK, S. & GRADZKI, Z. Comparison of polymerase chain reaction and dot hybridization with enzyme-linked immunoassay, virological examination and polyacrylamide gel electrophoresis for the detection of porcine rotavirus in faecal specimens. *Zentralbl Veterinaermed ReiteB*, v.46, n.9, p.623-634, 1999.

Recebido em 24/9/02

Aceito em 28/2/03