

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA E MOLECULAR DE AMOSTRAS
BRASILEIRAS DO VÍRUS DA LARINGOTRAQUEÍTE INFECCIOSA**

Cristiana Portz

PORTO ALEGRE, 2008

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA E MOLECULAR DE AMOSTRAS
BRASILEIRAS DO VÍRUS DA LARINGOTRAQUEÍTE INFECCIOSA**

Autora: Cristiana Portz

**Tese apresentada como requisito parcial
para obtenção do grau de Doutor em
Ciências Veterinárias na área de
Microbiologia Veterinária, especialidade
Virologia.**

Orientador: Cláudio Wageck Canal

Co-orientadora: Ana Cláudia Franco

**PORTO ALEGRE
2008**

Cristiana Portz

CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA E MOLECULAR DE AMOSTRAS
BRASILEIRAS DO VÍRUS DA LARINGOTRAQUEÍTE INFECCIOSA

Aprovada em 13 FEV 2008.

APROVADO POR:

Prof. Dr. Cláudio Wageck Canal
Orientador e Presidente da Comissão

Prof. Dra. Clarice Weiss Arns
Membro da Comissão

Prof. Dr. Nilo Ikuta
Membro da Comissão

Prof. Dra. Luciane Terezinha Lovato
Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me conceder saúde, paciência e persistência .

À minha família, pelo apoio mesmo estando mais distantes.

Ao Prof. Cláudio Wageck Canal pela oportunidade de trabalho, ampliação de conhecimento, orientação e amizade.

À minha co-orientadora Ana Cláudia Franco e ao seu marido Frans, pela incansável ajuda, amizade e empenho destinado à realização do trabalho.

À Profa. Ana Paula Ravazzolo pela atenção, dicas e companheirismo durante as etapas do trabalho e disponibilidade do Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular.

Ao professor Paulo Roehe pelo companheirismo e disponibilização dos Laboratórios de Virologia do Instituto de Pesquisas Desidério Finamor (IPVDF) e do Instituto de Ciências Biológicas (ICBS-UFRGS).

Ao CNPq, pelo apoio financeiro em forma de bolsa e a taxa de bancada, sempre bem vinda, para custeio de parte dos experimentos.

Aos colegas do Laboratório de Virologia da Faculdade de Veterinária da UFRGS, pelo apoio, amizade e profissionalismo. À Nilzane, Simone, Clarissa, Herbert, Josi, Laura, Eliana, Márcia, Laurício, Marisa, Fernanda, Flávio, Fabrício, Carla, André, Carine, Kaká, Lú, Bruna, pessoas muitíssimo importantes e queridas! Ficam lembranças muito boas de horas felizes que passamos juntos e pela ajuda mútua no trabalho.

À “mãe” Orema, que adota todos de uma maneira especial, e ainda nos auxilia nas tarefas de esterilização dos materiais. Com certeza ficará uma lembrança carinhosa do convívio no laboratório!

Aos colegas do grupo de Virologia do IPVDF, Paulinho, Ale, Diógenes, Samuel, Dadá, Thaís, Fabrício, Eduardo, Marcos, pessoas profissionais, que encontramos no momento certo e nos animam a seguir em frente! Agradeço a amizade e o convívio com vocês!

À Edna do Laboratório de Micologia/FAVET/UFRGS, pelas “caronas” e “desabafos”, amizade e carinho!

Ao Marcos, meu grande amor, que nos momentos difíceis me atura e me ilumina!

RESUMO

Atualmente, o Brasil é o segundo maior produtor e exportador mundial de frango. Doenças respiratórias compreendem o principal problema sanitário e levam à condenação de um grande número de carcaças, além de perdas na produtividade. Dentre estes problemas, o vírus da laringotraqueíte infecciosa (VLTi) tem adquirido grande importância nos últimos anos, devido a surtos da doença clínica, como em Bastos (SP) em 2002. Mais recentemente, VLTi vem sendo isolado de galinhas e perus das regiões Sudeste-Sul do Brasil. Dando continuidade aos trabalhos desenvolvidos no laboratório, um isolado de peru foi inoculado experimentalmente em galinhas e perus susceptíveis reproduzindo a doença de forma branda em ambas as espécies. Também foram testados diferentes cultivos celulares de linhagem CER, CEC-32, HD11, Vero e um primário de embrião de galinha para a efetiva replicação do ILTV, com o propósito de aumentar o título viral e a qualidade do DNA viral extraído. O cultivo primário de fibroblasto de embrião de galinha foi o cultivo mais eficiente na replicação do ILTV dentre todos os estudados. Isolados de perus e galinhas foram seqüenciados a partir das regiões genômicas da timidina kinase e glicoproteína C, e alinhados com uma cepa vacinal e amostras de referência, obtidas no GenBank, demonstrando alta similaridade entre as amostras, sugerindo uma origem comum recente. Com o propósito de desenvolvimento de um recombinante com deleção da glicoproteína E, com o objetivo de atenuar a virulência do ILTV, foi concluído um cassete de clonagem contendo as regiões flanqueadoras da glicoproteína E e um gene marcador EGFP.

Descritores: Vírus da laringotraqueíte infecciosa, cultivo celular, filogenia, clonagem.

ABSTRACT

Actually, Brazil is the second major poultry producer and exporting country. Respiratory diseases comprising the most important sanitary problems that leads to condemnation of many poultry carcass and productivity losses. Between these problems, the laryngotracheitis virus (ILTV) is displaying great importance following by outbreaks of the disease, such as that occurred in Bastos (SP), 2002, Brazil. Epidemiological studies showed the presence of antibodies from avian flocks and the existence of carrier birds without clear clinical signs. More recently, the ILTV has been isolated from chicken and turkeys of the southeast-south of Brazil. Continuing the works at laboratory, a turkey isolate was inoculated experimentally in susceptible chicken and turkeys and the reproducibility of a mild disease was displayed in both species. Also, different line cell cultures CER, CEC-32, HD11, Vero and a primary fibroblast cell culture were tested for the effective propagation of ILTV with the purpose to get greatest titers and the quality of viral DNA extracted. The primary fibroblast cell culture was the most efficient to replicate ILTV. Turkey and chicken isolates were sequenced from the regions of thymidine kinase and glycoprotein C and were aligned with a vaccine strain and reference strains (GenBank) displaying high homology between them, suggesting a common origin. A cloning cassette containing the regions flanking glycoprotein E and a marker gene EGFP was constructed with the purpose to develop a recombinant with deletion of the glycoprotein E.

Key words: Infectious laryngotracheitis virus, cell culture, phylogeny, cloning.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Artigo 1

- FIGURE 1- Electron micrograph taken from a pock of a CAM inoculated with LVV06BR turkey sample displaying one characteristic herpesvirus particle.....41
- FIGURE 2- Micrography of a tracheal chicken sample at day 8 pi (40x magnification). The arrow indicates one intranuclear inclusion body.41

Artigo 2

- FIGURE 1- Phylogenetic tree based on neighbor-joining method for the nucleotide sequences of the TK gene of ILTV isolates (EF552574, EF552578, EF552579, EF552575, EF552581, EF552580, EF552582, EF552577, EF552576, EF552583, EF552586, EF552584, EF552585) and the reference strain S83714.....57
- FIGURE 2- Phylogenetic tree based on neighbor-joining method for the nucleotide sequences of the gC gene of ILTV isolates (EU281341, EU281342, EU281337, EU281338, EU281340), reference strain U06635 and the vaccine strain.....57

ANEXO 1

- FIGURE 1 - Plasmídeos contendo as regiões flanqueadoras 5'gE e 3'gE.....106
- FIGURE 2 - Esquema do plasmídeo pCR 2.1 com a localização dos sítios de clonagem.....106
- FIGURE 3 - Esquema da construção do cassete de clonagem para posterior co-transfecção.....107

LISTA DE TABELAS

Artigo 1

TABLE 1- Samples identified by protocol number from Laboratório de Virologia Veterinária (LVV), year of isolation, species from which the samples were collected, and GenBank accession numbers of nucleotide sequences from amplification products.....39

TABLE 2- Time course of the experimental infection of turkeys (T) and chickens (C) showing the number of the five birds collected at each time that displayed respiratory symptoms, or the number of positive birds to ILTV by nested-PCR, virus detection in chicken and turkey embryo fibroblasts and CAMs of embryonated eggs from both species. The last line displays the percentage of positive samples throughout the experiment.....40

Artigo 2

TABLE 1- Identification of the field isolates from chicken and turkey with protocol number from Laboratório de Virologia Veterinária (LVV), gene analysed, species from which the samples were collected, GenBank accession numbers of the nucleotide sequences and the differences in the nucleotide and amino acid sequences of the TK and gC genes from field and reference strains.56

Artigo 3

TABLE 1- Titers of virus strains recovered after three passages of ILTV in different cell cultures. Titers were expressed in \log_{10} TCID₅₀/50 μ L. There was no detectable viral yield in HD11 and CEC-32 cell lines.....73

ANEXO 1

TABLE 1 - Primers utilizados na amplificação das regiões 5'e 3' flanqueadoras da gE.....105

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

| | |
|--------------------|--|
| $^{\circ}\text{C}$ | grau Celsius |
| μL | microlitros |
| pb | pares de base |
| RFLP | restriction fragment length polymorphism |
| ATCC | <i>American Type Culture Collection</i> |
| EDTA | ácido etilenodiaminotetracético |
| MgCl_2 | cloreto de magnésio |
| PCR | <i>polymerase chain reaction</i> |
| pH | potencial de hidrogênio |
| UI | unidade internacional |
| Kb | kilobase |
| pmol | picomolar |
| LTi | laringotraqueíte infecciosa |
| ILTV | <i>Infectious laryngotracheitis virus</i> |
| nm | nanômetro |
| pi | pós-infecção |
| Tris | tris (hidroximetil) aminometano |
| CEO | <i>chicken embryo origin</i> |
| TCO | <i>tissue embryo origin</i> |
| gC | glicoproteína C |
| TK | <i>thymidine kinase</i> |
| CER | <i>chicken embryo related cells</i> |
| HD11 | <i>chicken macrophage cell line</i> |
| Vero | <i>African green monkey kidney cells</i> |
| CEF | <i>primary chicken embryo fibroblast cells</i> |
| CEC-32 | <i>avian fibroblast cell line</i> |
| GaHV-1 | <i>Gallid herpesvirus 1</i> |
| PsHV-1 | <i>Psittacid herpesvirus 1</i> |
| EGFP | <i>Enhanced green fish protein</i> |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 10 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 13 |
| 2.1. Histórico e distribuição geográfica..... | 13 |
| 2.2. Importância econômica..... | 14 |
| 2.3. Etiologia..... | 14 |
| 2.4. Replicação viral..... | 15 |
| 2.5. Transmissão e latência do VLTI..... | 15 |
| 2.6. Patogenia..... | 17 |
| 2.7. Diagnóstico..... | 18 |
| 2.8 Vacinas diferenciais e deleção da glicoproteína E de herpesvírus..... | 20 |
| 3. ARTIGOS CIENTÍFICOS..... | 22 |
| 3.1 Natural infection of turkeys with infectious laryngotracheitis virus..... | 23 |
| 3.2 Genetic analysis of glycoprotein C and thymidine kinase genes from Brazilian strains of infectious laryngotracheitis virus..... | 42 |
| 3.3 Comparison of different cell cultures for replication of infectious laryngotracheitis virus from chickens..... | 58 |
| 4. DISCUSSÃO..... | 74 |
| 5. CONCLUSÕES..... | 79 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 80 |
| ANEXOS..... | 89 |
| Anexo 1. Deleção da glicoproteína E (gE) do vírus da laringotraqueíte infecciosa aviária (ILTV) | 89 |

1. INTRODUÇÃO

A avicultura brasileira recebe destaque internacional fechando o ano de 2007 com uma produção superior a 10 milhões de toneladas de carne, e exportações acima de três milhões de toneladas. Esses resultados de produção elevam o Brasil à posição de segundo maior produtor mundial. Isso ocorreu devido a uma série de fatores como a implementação de programas de manejo e qualidade para atender a exigência de diferentes mercados importadores, como a União Européia e o Japão. Como as exigências são altas para atender o mercado externo e interno, a avicultura brasileira se beneficia com as políticas adotadas e mão de obra qualificada. Todavia, a avicultura da carne ficou susceptível às crises internacionais, como a atual influenza aviária que vem afetando de forma dramática o consumo na Europa Ocidental e tem causado reflexos severos nas importações do Oriente Médio, contudo demonstrou início de recuperação em 2006.

As enfermidades respiratórias compreendem o principal problema sanitário e levam à condenação de um grande número de carcaças, além de perdas na produtividade. O sistema de criação moderno, baseado em alta densidade, contribui para a deterioração da qualidade do ar aumentando os riscos da ocorrência de enfermidades tornando seu controle um novo desafio. A Laringotraqueíte Infecciosa (LTI) é uma infecção aguda do trato respiratório das aves que causa prejuízos econômicos como a diminuição dos parâmetros produtivos. Esta enfermidade tem uma importância maior ou menor dentro do cenário de sanidade avícola dependendo de cada país.

Embora a LTI seja considerada doença exótica no Brasil, já vem sendo descrita desde 1974, em aves com intensa traqueíte hemorrágica. Os sintomas clínicos variam desde uma forma com apresentação silenciosa até dispnéia e traquéias com intensa hemorragia que facilitam uma infecção secundária por outros agentes. No Brasil, os últimos relatos oficiais da presença deste vírus estão restritos à região de Bastos-SP e às aves de postura comercial. Estudos epidemiológicos demonstram a ocorrência de anticorpos em plantéis avícolas nos Estados do Rio Grande do Sul, São Paulo, Minas Gerais e a existência de aves portadoras sem sinais clínicos aparentes incluindo algumas aves criadas em fundo de quintal.

Uma particularidade desta enfermidade é que o controle realizado através de um programa de vacinação com uma cepa viva atenuada pode servir como fonte de infecção. Por se tratar de um herpes vírus, o estado de latência no nervo trigêmeo ocorre e há reversão de

virulência, através de passagens do vírus vivo atenuado, em aves susceptíveis. Por esse motivo, a vacinação no Brasil é permitida, com autorização do Ministério da Agricultura, apenas em regiões endêmicas, como a de Bastos-SP.

Nos últimos anos, nosso grupo de pesquisa vem desenvolvendo estudos sobre isolados de ILTV provenientes de vários Estados brasileiros. Em um primeiro estudo, um isolado de ILTV de perus, proveniente de granjas comerciais, foi caracterizado por técnicas de virologia clássicas. Para um melhor entendimento dos isolados brasileiros, um segundo estudo foi realizado a partir do seqüenciamento de parte do gene da timidina quinase (TK) e da glicoproteína C (gC) do genoma do ILTV. O objetivo deste estudo foi encontrar alguma diferença a nível de nucleotídeos e ou aminoácidos, dentre os isolados de ILTV provenientes de perus e galinhas. Em um terceiro estudo, analisou-se a susceptibilidade de quatro cultivos celulares de linhagem, incluindo um cultivo celular primário à infecção pelo ILTV, com o objetivo de se obter um cultivo celular capaz de replicar o ILTV em altos títulos e para posterior utilização nos demais experimentos.

A vacinação utilizando cepas vivas atenuadas por múltiplas passagens em ovos embrionados ou cultivo celular tem sido a principal forma utilizada para controlar a disseminação do ILTV. Entretanto, o vírus latente pode ser reativado por fatores de estresse e pode ser transmitido de uma ave portadora para aves susceptíveis, representando um sério problema e comprometendo esforços para o controle desta enfermidade. Tanto cepas de campo quanto as vacinais produzem infecções latentes. Nesse sentido, um quarto estudo almejou o desenvolvimento de um recombinante com deleção da glicoproteína E, com o propósito de se reduzir a virulência e latência do ILTV, utilizando a técnica de recombinação sítio dirigida.

Portanto, o presente trabalho é composto por quatro artigos, sendo que o primeiro descreve o diagnóstico de infecções naturais por ILTV em perus. Para isto, um isolado de ILTV de perus foi inoculado em galinhas e perus susceptíveis que foram avaliados por isolamento viral, PCR, seqüenciamento, imunofluorescência e microscopia eletrônica. No segundo artigo, foi avaliada a diversidade genética entre os isolados brasileiros do ILTV provenientes de frangos e perus comerciais e de galinha de fundo de quintal. O terceiro artigo descreve a susceptibilidade de diferentes cultivos celulares para a replicação do ILTV. No Anexo 1, está descrito um trabalho em que foi concluído um cassete de clonagem contendo as regiões flanqueadoras da gE e um gene marcador que expressa a proteína verde fluorescente

de peixe (GFP), com o objetivo de deleção da glicoproteína E do ILTV de um isolado de campo, para a produção de uma vírus recombinante.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Histórico e distribuição geográfica

A Laringotraqueíte Infecciosa Aviária (LTI) é de uma doença respiratória causada por um herpes vírus que acomete principalmente as galinhas de postura comercial, de distribuição geográfica cosmopolita. Pertence à Lista B da OIE e não é uma zoonose. A doença foi primeiramente descrita em 1920, nos EUA, e assim como a maioria das doenças emergentes da época, vários nomes foram utilizados para descrever a doença, como bronquite infecciosa, traqueolaringite, traqueíte infecciosa e difteria aviária. O termo laringotraqueíte foi utilizado no começo da década de 30 e o nome laringotraqueíte infecciosa aviária foi adotado em 1931 pelo *Special Committee on Poultry Diseases of the American Veterinary Medical Association* (COVER, 1996). Nas áreas onde a produção avícola desenvolve-se em larga escala, existe a expectativa de uma maior prevalência e persistência do herpes vírus responsável pela laringotraqueíte infecciosa (JORDAN, 1993). A forma suave da doença já foi descrita por vários pesquisadores na Grã Bretanha, Austrália, EUA e Nova Zelândia (BAGUST & GUY, 1997). A partir de 2001, foi identificada a forma de laringotraqueíte infecciosa (LTI) Silenciosa no Estado da Geórgia/EUA, cuja frequência vem aumentando continuamente (SELLERS, 2004). A LTI tem sido diagnosticada em todos os continentes, inclusive em países vizinhos ao Brasil, como Argentina, Colômbia e Uruguai. No Brasil, a doença foi descrita por Hipólito et al. (1974), em aves com sinais clínicos respiratórios e intensa traqueíte hemorrágica. Vargas (2000) analisou 1271 soros procedentes de plantéis avícolas do Estado do Rio Grande do Sul e, através do teste de ELISA, constatou que há maior incidência em aves de postura comercial com possibilidade da presença da forma silenciosa da LTI. Em 2003, Beltrão et al. (2003) isolou o vírus da laringotraqueíte infecciosa (ILTV) e confirmou sua presença em plantéis avícolas do sul do Brasil coletando suabes e amostras de tecido de traquéia de lotes de galinhas com sinais respiratórios. No ano de 2003, confirmou-se ILTV em quatro lotes de poedeiras comerciais do Estado de SP através de análises histopatológica, virológica e sorológica (ITO et al., 2003). Surtos de LTI no Estado de São Paulo foram confirmados pela técnica de PCR e posterior seqüenciamento do gene P32 do genoma do ILTV (VILLAREAL et al., 2004). Recentemente, foram detectados anticorpos contra LTI procedentes de plantéis avícolas de postura comercial, matrizes de corte e aves caipiras, pela técnica de ELISA indireto, no Estado de Minas Gerais (SILVA & RISTOW, 2007). No

Estado de São Paulo, foram analisadas granjas de postura comercial, após dois anos de surto clínico, onde detectou-se ILTV em isolados de traquéia e conjuntiva através da técnica de PCR da região do gene da glicoproteína E (CHACÓN et al., 2007).

2.2 Importância econômica

A importância econômica e social da avicultura brasileira coloca o setor em evidência no âmbito internacional devido a mão de obra cada vez mais qualificada e altos índices de produção interna e exportação. A indústria avícola brasileira é a segunda maior produtora e exportadora de carne de frango do mundo (ABEF, 2006). Os desafios respiratórios mais presentes no campo estão relacionados a causas multifatoriais, envolvendo microrganismos, agentes imunossupressores e condições ambientais desfavoráveis que levam à condenação de um grande número de carcaças, além de perdas na produtividade. As enfermidades que acometem o sistema respiratório são os distúrbios mais frequentes observados na avicultura. O sistema de criação baseado em alta densidade de aves por galpão contribui para a diminuição da qualidade do ar, aumentando os riscos de ocorrência de várias enfermidades, como o ILTV, tornando seu controle um desafio na atualidade (INOUE, 2005). A LTI tem adquirido grande importância nos últimos anos devido a surtos da doença clínica, como em Bastos (SP), em 2002. A LTI pode ser responsável por severas perdas econômicas devido à alta morbidade e mortalidade, queda na produção de ovos e piora no desempenho dos frangos. Os prejuízos com as galinhas poedeiras ocorrem nos lotes de início de produção, onde se observa alta refugagem, ausência de pico de produção e mortalidade (GAMA, 2004).

2.3 Etiologia

O VTLI ou Gallid herpesvirus tipo 1 (GaHV-1) (ROIZMAN, 1982) pertence a família *Herpesviridae*, subfamília *Alfaherpesvirinae*, gênero *Iltovirus*, sendo capaz de provocar uma importante doença respiratória nas galinhas que ocorre em todo o mundo. O genoma é constituído por fita dupla de DNA, com aproximadamente 155 Kb, icosaédrico medindo de 80 a 100 nm de diâmetro, envelopado e possuindo em torno de 48% de resíduos de guanina (G) e citosina (C) (GUY & BAGUST, 2003). Análises de restrição revelaram que o genoma DNA de fita dupla é composto por duas regiões, longa (UL) e curta (US), sendo a região US flanqueada por repetições invertidas (IR e TR) (WILD et al., 1996). O ILTV é sensível aos agentes lipolíticos e desinfetantes comuns (HANSON, 1991). Onze ORF's conservadas do

ILTV possuem homologia com as glicoproteínas do genoma do herpes vírus simplex tipo 1 (HSV-1) que são gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gJ, gK, gL e gM (FUCHS et al., 2007).

Recentemente, encontrou-se uma inversão dentro da UL do genoma do ILTV que também havia sido identificada no genoma do *Psittacid herpesvirus 1* (PsHV-1), causador da doença de Pacheco. A presença de genes específicos para o *Gallid herpesvirus 1* (GaHV-1) e PsHV-1 podem indicar um ramo separado dentro da árvore filogenética dos herpes vírus. Atualmente, apenas o ILTV está classificado como membro do gênero *Iltovirus* (DAVISON et al., 2005). A partir destes estudos recentes, o genoma do PsHV-1 poderá ser agrupado dentro deste mesmo gênero.

2.4 Replicação viral

A replicação do ILTV tem sido pouco investigada até o momento, entretanto parece ser similar aos demais alfa herpesvírus assim como o herpes simplex vírus (HSV-1) (ROIZMAN & KNIPE, 2001). O vírus inicia sua infecção através da adsorção a receptores celulares específicos, seguido de fusão do envelope viral com a membrana plasmática da célula hospedeira. O nucleocapsídeo viral penetra no citoplasma celular onde é transportado ao núcleo por microtúbulos celulares (WILD et al., 1996). O DNA viral chega ao núcleo da célula hospedeira através de poros nucleares onde ocorre a replicação do genoma e montagem dos nucleocapsídeos. Os novos nucleocapsídeos formados, migram através da membrana nuclear e se acumulam em vacúolos no retículo endoplasmático do citoplasma, onde adquirem o envelope. As partículas envelopadas, por sua vez, saem da célula hospedeira por lise, ou por fusão da membrana e exocitose (GUO et al., 1993). No entanto, dentre os poucos virions completos, várias partículas sem nucleocapsídeos são formadas. Provavelmente, estes erros estruturais são em parte responsáveis pelos baixos títulos do ILTV encontrados nas culturas de células (FUCHS et al., 2007).

2.5 Transmissão e latência do ILTV

A principal forma de transmissão ocorre através do contato direto de aves com aves susceptíveis (BAGUST & GUY, 1997). As portas naturais de entrada do vírus são as vias nasal e ocular, mas também a infecção pode ocorrer por via oral. Após a entrada, segue-se a fase de replicação viral nos seios nasais, traquéia e pulmões. O vírus pode permanecer latente no nervo trigêmeo ou persistir no trato respiratório como infecção inaparente nas aves

portadoras (GAMA, 2004). O vírus é eliminado das aves doentes e/ou portadoras pelas secreções oronasais, podendo alcançar outras aves susceptíveis pelo ar, fômites, esterco, cama e trânsito de funcionários pela granja. O período de incubação varia de 6 a 12 dias após infecção natural, via rota ocular e respiratória, e de 2 a 4 dias após inoculação experimental via intratraqueal (FUCHS et al., 2007). As aves portadoras podem, freqüentemente, eliminar o ILTV e esta disseminação pode variar e aumentar de intensidade por estresses como o início de postura, alta lotação, excesso de calor ou frio, mudança na alimentação, ruídos, alta concentração de amônia e transporte dentre outros (HUGHES et al., 1989). No surto da região de Bastos-SP, a disseminação ocorreu de forma rápida entre galinhas de um mesmo galpão e galpões com aves do mesmo lote (GAMA, 2004).

Assim como outros alfa herpesvírus, o ILTV também causa infecção latente no nervo trigêmeo. Bagust et al. (1986) reportou pela primeira vez a infecção do gânglio trigêmeo de galinhas desafiadas com uma cepa australiana bastante virulenta, após quatro a sete dias de inoculação. A reativação do vírus latente no nervo trigêmeo, reportada por Kaleta et al. (1986), foi detectada em até 15 meses após a vacinação de um lote na Alemanha. Williams et al. (1992), com o auxílio da PCR, confirmou que o gânglio trigêmeo é o principal sítio de latência do ILTV. Em 1989, Hughes e colaboradores reportaram a re-excreção do vírus em galinhas com infecção latente após algum estresse.

A virulência da cepa vacinal, viva atenuada, pode ser aumentada em combinação com fatores adversos como co-infecção com outros patógenos respiratórios, pouca ventilação, alta densidade de aves por galpão e por várias passagens do vírus em aves susceptíveis (HAN et al., 2002). A vacinação com vacinas vivas atenuadas por múltiplas passagens em ovo embrionado (CEO) ou em cultivo celular (TCO) tem sido a principal forma utilizada para controlar a disseminação da LTI (GUY & BAGUST, 2003), com exceção do Brasil, pois o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) apenas permite a vacinação em áreas endêmicas, como ocorreu em Bastos-SP. Nos EUA tem se observado o aumento do número de epidemias de LTI nos últimos anos e se acredita que a causa da maioria dessas epidemias sejam os vírus derivados das vacinas CEO, que persistem em matrizes de corte e postura e servem como fonte de infecção para os frangos de corte (DAVISON et al., 2005). Evidências experimentais demonstram que as cepas vacinais atenuadas, especialmente das vacinas CEO, podem reverter sua virulência com facilidade após passagens consecutivas em aves (GUY et al., 1991), ou após recrudescência viral da forma latente (HUGHES et al., 1991).

WILLIAMS et al., 1992; HAN et al., 2002). Estudos utilizando a técnica de polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição (RFLP), no genoma viral de isolados americanos indicaram que os mesmos são semelhantes às cepas vacinais provenientes de CEO (OLDONI & GARCIA, 2007).

Existem, aproximadamente, 2% de aves portadoras de infecção latente nas granjas com reativação viral por fatores de estresse e outros patógenos imunossupressores. Ambos isolados de campo e o vacinal têm demonstrado estabelecer infecção latente em galinhas (BAGUST et al., 1986). Portanto, a imunização com vacina viva atenuada protege as aves contra a doença clínica em locais endêmicos, entretanto não impede uma nova infecção por uma cepa de campo virulenta, e a infecção latente indesejada podendo haver uma reativação viral isolada ou associada a outros patógenos. Alguns países evidenciaram que após a vacinação contra o ILTV, ocorreram surtos da doença (SCHOLTZ et al., 1994).

2.6 Patogenia

O ILTV pode infectar galinhas, perus experimentalmente infectados (WINTERFIELD & SO, 1968) e faisões (CRAWSHAW & BOYCOTT, 1982) susceptíveis. A doença afeta aves de todas as idades, embora na maioria das ocorrências os sinais característicos sejam observados em aves adultas. A susceptibilidade da infecção decresce com a maturidade, sendo a idade de 10 semanas e a época de início da produção, os períodos de maior ocorrência da LTI nas aves (SCHMIDT, 1988). O vírus possui afinidade por epitélio respiratório, replicando no epitélio da laringe, traquéia e outras membranas mucosas como a conjuntiva, os sinos respiratórios, sacos aéreos e pulmões.

Através de uma técnica de nested-PCR, referente a região do gene da glicoproteína E do genoma do ILTV, foram diagnosticadas como positivas para a presença de DNA viral, isolados de traquéia e conjuntiva detectando infecções clínicas e latentes (CHACÓN et al., 2007). Rodriguez-Avila et al. (2007) demonstraram que as vacinas atenuadas em CEO e TCO comparadas possuem um tropismo similar apresentando replicação localizada em conjuntiva ocular e traquéia. As duas vacinas foram capazes de transmitir o ILTV de aves vacinadas para aves não vacinadas por contato direto. Rápido e frequentemente foram detectados altos títulos de vírus em aves vacinadas ou não, sendo que as vacinas de CEO se replicaram mais rapidamente do que a vacina de TCO.

Algumas cepas são altamente citolíticas nesses tecidos, principalmente traquéia, resultando em severo dano epitelial e hemorragia. A manifestação da doença apresenta-se de forma aguda caracterizada por dispnéia severa, tosse, expectoração de exsudato mucosanguinolento e, em casos severos, morte em 2 ou 3 dias (GAMA, 2004). A taxa de mortalidade varia de 30 a 70%. A presença do vírus pode ser detectada em tecido traqueal de 6 a 8 dias pós-infecção (ROBERTSON & EGERTON, 1981). Aves com infecção latente não apresentam sinais clínicos aparentes e podem se comportar como portadoras e disseminar o vírus para outras aves susceptíveis até 16 meses após a infecção (TURNER, 1972). Achados microscópicos variam de acordo com o estágio da doença. Ocorre infiltração de células inflamatórias na mucosa, perda dos cílios do epitélio respiratório com posterior destruição total do epitélio e vasos sanguíneos da lâmina própria. Corpúsculos de inclusão intranuclear podem ser encontrados no epitélio apenas nos primeiros dias após infecção (PURCELL, 1971).

2.7 Diagnóstico

Desde o final do ano de 2002, um dos agentes respiratórios mais discutidos em congressos e simpósios brasileiros é o Gallid herpesvirus 1, responsável pela laringotraqueite infecciosa. Entretanto, o diagnóstico do ILTV requer uma assistência laboratorial para ser diferenciado de outras doenças respiratórias e ou infecções secundárias como *Pasteurella multocida*, *Escherichia coli*, *Haemophilus paragallinarum*, *Mycoplasma sp.*, *Ornithobacterium sp.*, pneumovírus aviário, vírus da bronquite infecciosa e vírus da doença de Newcastle dentre outros agentes, que podem se manifestar sozinhos ou coexistir na mesma doença respiratória em um determinado momento da vida do lote (GAMA, 2004). O diagnóstico baseia-se na detecção de corpúsculos de inclusão intranucleares no epitélio do trato respiratório, isolamento viral, detecção do antígeno viral ou DNA viral em tecidos ou a detecção de anticorpos através de sorologia. O isolamento viral pode ser feito através da inoculação de suspensões virais de exudatos respiratório e conjuntival, raspados de traquéia ou tecidos, na membrana córion-alantóide (MCA) de ovos embrionados SPF de 9 a 10 dias de incubação. Após dois a cinco dias de inoculação, há produção de placas opacas na MCA ou morte embrionária. Os cultivos celulares primários atualmente utilizados para a propagação do VLTI incluem o *chicken embryo liver* (CEL), *chicken embryo kidney* (CK), *chicken embryo fibroblast* (CEF), *chicken embryo lung* (CEL) e células de linhagem como a *African*

green monkey kidney cells (Vero) (HUGHES & JONES, 1988). Embora o ILTV venha sendo replicado preferencialmente, em cultivos primários CK e CEL, as cepas de VLTI pouco patogênicas ou LTI silenciosa não foram capazes de causar efeito citopático nestes respectivos cultivos nem mesmo em várias células de linhagem, após passagens consecutivas (SELLERS et al., 2004). Anticorpos específicos para o ILTV podem ser utilizados em diagnóstico sorológico através das técnicas de vírus neutralização, ágar-gel imunodifusão, imunofluorescência indireta e *enzyme linked immuno sorbent assay* (ELISA) (HITCHNER et al., 1977; JORDAN & CHUBB, 1962; MEULEMANS & HALEN, 1982). A técnica de ELISA também tem sido utilizada para a detecção de proteínas virais em exudatos de traquéia (YORK et al., 1988). Entretanto, mais recentemente, a detecção de proteína por teste de imunoperoxidase e detecção de DNA viral pela PCR convencional ou PCR em tempo real têm demonstrado ser ótimas ferramentas para a detecção viral (ABBAS & ANDREASEN, 1996; CREELAN et al., 2006; KIRKPATRICK et al., 2006; SCHOLZ et al., 1994; WILLIAMS et al., 1992). Em combinação com a técnica de polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição (PCR-RFLP) e o seqüenciamento de DNA viral a partir de uma PCR também contribuíram para a diferenciação de isolados virais em estudos epidemiológicos e filogenéticos (CREELAN et al., 2006; KIRKPATRICK et al., 2006). No entanto, o uso rotineiro de análise por RFLP de genomas virais com objetivos epidemiológicos é limitado devido à dificuldade de purificação de DNA viral puro em grande quantidade (OLDONI & GARCIA, 2007). Análises moleculares mais profundas sobre o genoma completo do ILTV também são prejudicadas pela inexistência de um sistema de cultivo celular ótimo para a propagação do ILTV (FUCHS et al., 2007).

Mais recentemente, um protocolo de nested-PCR sensível e específico para a região da timidina kinase foi desenvolvido detectando positividade em isolados brasileiras de galinhas (BELTRÃO, 2003) e para a região da glicoproteína E (CHACÓN et al., 2007). Em países onde a vacinação é aconselhada, como nos Estados Unidos, foram utilizados protocolos de PCR-RFLP com o objetivo de indicar evidências moleculares de que os surtos de LTI estavam relacionados com isolados vacinais que reverteram virulência após passagens em aves susceptíveis. (OLDONI & GARCIA, 2007).

2.8 Vacinas diferenciais e deleção da glicoproteína E de herpes vírus

Para a prevenção do ILTV, vacinas com vírus vivo têm sido utilizadas por muitas décadas. Na época da descoberta da LTI, as galinhas eram imunizadas através da inoculação cloacal de uma cepa virulenta (BRANDLY & BUSHNELL, 1934). Posteriormente, isolados de ILTV de campo foram atenuados através de passagens em ovos embrionados e cultivos celulares (SAMBERG & ARONOVIC, 1969). As cepas vacinais obtidas poderiam ser administradas individualmente via ocular, assim como para aplicação em massa via aerossol ou pela água de beber (GUY & BAGUST, 2003). A maioria destas vacinas funciona eficazmente, entretanto, muitas ainda possuem uma virulência residual que pode aumentar significativamente após passagens em aves susceptíveis e resultar em surtos de LTI (ANDREASEN et al., 1990; GUY et al., 1990).

Para resolver o problema de reversão da virulência de algumas cepas vacinais, foram produzidas e testadas, eficazmente, as vacinas inativadas e vacinas de subunidades contendo glicoproteínas imunogênicas purificadas (BARBOOM et al., 1986; YORK & FAHEY, 1991). Entretanto, o alto custo de produção não compensaria a imunização em larga escala. Portanto, o desenvolvimento de vacinas contra LTI contendo o vírus vivo geneticamente modificado parecia ser mais promissor. Proteínas de envelope viral imunogênicas foram expressadas em vetores de vírus aviários, como no herpesvírus da doença de Marek e no vírus da varíola aviária (Bouba aviária), atenuado resultando em uma boa imunização após desafio pelo ILTV selvagem (SAIF et al., 1994; TONG et al., 2001; DAVISON et al., 2006). Mais uma vez, seria necessária uma imunização individual que dificultaria a vacinação em massa. Mais recentemente, estuda-se a geração de mutantes de ILTV atenuados por deleção de genes que determinam virulência. A infectividade do DNA genômico do ILTV permite a geração de vírus mutantes através de uma recombinação homóloga com co-transfecção plasmidial, que carrega a deleção ou inserção desejada. O sucesso desta construção se baseia no conhecimento dos mecanismos da replicação viral, entretanto este método ainda é prejudicado pela falta de células de linhagem eficientes para a propagação e manipulação do ILTV (FUCHS et al., 2007).

Atualmente, quatorze genes do genoma do ILTV foram deletados com sucesso (UL0, ORF A, ORF B, ORF C, ORF D, ORF E, UL10, UL21, UL23, UL47, UL49.5, UL50, US4, US5), sendo todos indispensáveis para a replicação viral *in vitro*, desde que se tenha um cultivo celular capaz de propagar o ILTV recombinante e produzir placas virais. Portanto,

estes genes, aparentemente, não representam ser cruciais para a adaptação nas células hospedeiras, embora outras funções importantes de infecção em galinhas susceptíveis não possam ser excluídas (FUCHS et al., 2007).

Um recombinante do ILTV com deleção do gene da timidina kinase diminuiu a virulência e induziu proteção em galinhas SPF desafiadas com vírus virulento (HAN et al., 2002). Recentemente, o desenvolvimento de um ILTV mutante gE e gI negativo mostrou uma redução na capacidade de dispersão viral célula-célula com conseqüente falha na produção de placas virais (DEVLIN et al., 2006).

A glicoproteína E (gE) dos alfa herpes vírus parece estar associada à virulência e latência viral. A gE e gI do herpes vírus simplex (HSV) estão associados a eficiente transmissão neurônio-neurônio do vírus nas sinapses nervosas (DINGWELL et al., 1995). Mutantes de BoHV gE negativos são avirulentos *in vivo* e têm sido utilizados como vacinas protegendo contra o desafio por cepas de campo (REBORDOSA et al., 1996). A deleção da gE, localizada na região US do herpes vírus bovino tipo 1 (BoHV-1), sugere uma diminuição da dispersão célula-célula e virulência do vírus. Recombinantes de herpes vírus eqüino tipo 4 (EVH-4) gE e gI negativos, conferiram diminuição da virulência em potros desafiados por uma cepa de campo (DAMIANI et al., 2000).

As vacinas diferenciais possuem a vantagem de permitir a distinção da resposta imune induzida por animais vacinados e por animais infectados com vírus selvagem ou de campo (VAN OIRSCHOT et al., 1999). Além de possibilitar a diferenciação de respostas imunes de animais enfermos e vacinados, o uso de vacinas diferenciais tem ainda a vantagem de reduzir a circulação do vírus de campo facilitando o controle das infecções virais.

3. ARTIGOS CIENTÍFICOS

3.1 Natural infection of turkeys with infectious laryngotracheitis virus*

* Manuscrito aceito para publicação na forma de artigo original no periódico científico
Veterinary Microbiology.

Natural infection of turkeys by infectious laryngotracheitis virus

Cristiana Portz ^a, Nilzane Beltrão ^a, Thales Quedi Furian ^a, Alfredo Bianco Junior ^a, Marisa Macagnan ^a, Josiane Griebeler ^a, Carlos André Veiga Lima Rosa ^b, Edson Moleta Colodel ^c, David Driemeier ^c, Alberto Back ^d, Monika Barth ^e, Cláudio Wageck Canal ^{a*}

^a Laboratório de Virologia, Faculdade de Veterinária da UFRGS, Av. Bento Gonçalves, 9090, Bairro Agronomia, Porto Alegre, Brazil.

^b Laboratório de Análises Genéticas-DNA, Centro de Ciências Agroveterinárias da UDESC, Lages, Santa Catarina, Brasil.

^c Laboratório de Patologia Veterinária, Faculdade de Veterinária da UFRGS, Av. Bento Gonçalves, 9090, Bairro Agronomia, Porto Alegre, Brasil.

^d Centro de Diagnóstico Veterinário Brasil Sul Ltda, Mercolab, Cascavel, Paraná, Brasil

^e Laboratório de Ultra-estrutura viral do Instituto Oswaldo Cruz IOC/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil.

* Corresponding author. Tel.: +55 51 3308 6926; fax: +55 51 3308 7305; E-mail address: claudio.canal@ufrgs.br

Abstract

The infectious laryngotracheitis virus (ILTV) is an important respiratory pathogen of chickens that also infects pheasants and peafowl. Epidemiologically non-related commercial turkey flocks with clinical signs such as tracheitis, swollen sinuses, conjunctivitis and expectoration of bloody mucus were examined for the presence of the virus. Laboratory ILTV detection was performed by virus isolation in embryonated eggs and cell cultures, PCR and sequencing of amplification products, histopathology, indirect immunofluorescence and electron microscopy. One ILTV turkey isolate was also experimentally inoculated into susceptible

chickens and turkeys, reproducing a mild respiratory disease. This is the first description of natural infections with ILTV in turkeys.

Keywords: Infectious laryngotracheitis virus, turkey, avian pathology, diagnosis

1. Introduction

The infectious laryngotracheitis virus (ILTV, *Gallid herpesvirus 1*) is found in intensive broiler production areas and causes respiratory disease in chickens worldwide (Guy and Bagust, 2003). Classified as a member of the subfamily *Alphaherpesvirinae* of the family *Herpesviridae*, it is the only current member of the genus *Iltovirus* (Johnson and Tyack, 1995). ILTV infections of chickens in Brazil were reported based on serological, virological and histopathological tests (Beltrão et al., 2003; Silva and Ristow, 2007). The isolation of ILTV from field material has been described using embryonated chicken eggs inoculated onto the chorioallantoic membrane (CAM) (Hughes and Jones, 1988) and in primary kidney and liver cell cultures of chickens or chicken embryos (Chang et al., 1960; Guy and Bagust, 2003). More recently, DNA detection by conventional polymerase chain reaction (PCR) or real-time PCR have become the methods of choice for virus diagnosis (Scholtz et al., 1994; Beltrão et al., 2004; Villarreal et al., 2004; Creelan et al., 2006; Chacón et al., 2007; Fuchs et al., 2007). ILTV has a very narrow host range *in vivo*, and only domestic chickens, pheasants and peafowl have been described as natural hosts (Guy and Bagust, 2003; Crawshaw and Boycott, 1982). Although experimental infection of the upper respiratory tract of young turkeys was described by Winterfield and So (1968), no cases of natural infection were found in this species so far. In our study, natural turkey infections were diagnosed by clinical signs,

PCR, virus isolation in CAM, electron microscopy and histopathology, and the disease was reproduced into susceptible chickens and turkeys.

2. Materials and Methods

2.1. Samples

From 2002 to 2005, pools of samples from four turkey commercial broiler flocks were collected by veterinarians and sent to our laboratory to be analyzed (Table 1). Turkey samples were obtained from flocks that were about 100 days old and had respiratory signs that included nasal discharge, depression, marked dyspnea and tracheitis. Some of the samples showed hyperemic and hemorrhagic tracheas. A vaccine sample (Laryngo-vac, Solvay Animal Health Inc., IA, USA) was used as a positive control. The vaccine was imported in 1994 for research purposes with permission of the Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Brazilian Department of Agriculture). A vaccine for turkey herpesvirus (HVT) of serotype 3 Marek's disease virus (Biovet, Brazil) was used as a negative control. Also, the samples were tested for Marek's disease viruses by real-time PCR (Islam et al., 2004), avian leukosis virus by PCR (Garcia et al., 2003), avipoxvirus (Fallavena et al., 2002) and reovirus was commercially performed by Simbios Biotecnologia (Canoas, RS, Brazil).

Each pool of tracheas was slit longitudinally, and the epithelium was scrapped off together with associated mucus using a scalpel blade. Scrapings were placed in 1.5 mL PBS with antibiotics. The mixture was vortexed vigorously and centrifuged to clarify the supernatant. These samples were aliquoted and stored at -70°C until use.

2.2. Virus isolation in CAM

Specific pathogen-free embryonated eggs of chickens and commercial turkeys after nine days of incubation were inoculated with 0.2 mL of the samples, which was dropped onto the chorioallantoic membrane (CAM). Each sample was grown at least three times in CAM from both species to increase the titer of the virus. CAMs were examined for pock formation (opaque plaques on the CAM) at five to seven days post inoculation. The embryos that died within the first 24 hours were classified as nonspecific deaths.

2.3. DNA amplification and sequencing

Virus DNA was extracted by phenol-chloroform method and was performed directly from field samples or from the experimentally infected birds. The PCR using the external primers was performed as described previously (Abbas et al., 1996). The internal primers were selected to amplify a 647 bp fragment with the following primer sequences: 5'ACGATGACTCCGACTTTC 3' (positions 4501-4519 from the sequence determined by Griffin and Boursnell, 1990) and 5' CGTTGGAGGTAGGTGGTA 3' (positions 5112-5130). The PCR reaction mixture contained 10 mM Tris-HCl pH 8.5, 50mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, 200 μM of each dNTP, 20 pmol of each primer, 1 unit of Taq DNA polymerase (Cbiot, Porto Alegre, Brazil) and 50ng of DNA template in a final volume of 25 μL. The nested-PCR cycling program included 30 cycles of denaturing at 95°C for 1 minute, annealing at 50°C for 1 minute, extension at 72°C for 1.5 minutes and a final extension cycle at 72°C for 10 minutes.

The vaccine sample and two samples of each field sample from positive turkey flocks were sequenced. The 647 bp amplification products from the region of the thymidine kinase gene were purified with GFX DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Biosciences,

Sweden). Both strands were sequenced with a reaction containing 80 ng of target DNA and five pmol of forward and reverse primers. Product sequences were resolved on an automatic sequencer (ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, CA, USA). The resulting sequences were assembled and analyzed using the BioEdit software package (Hall, 1999) and the NCBI's (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) analysis tools. They were compared with the related sequence from strain 632 (Keeler et al., 1991), GenBank accession number S83714.

2.4. Experimental infection

One ILTV isolate from turkeys (LVV06BR) was chosen to infect susceptible chickens and turkeys to test whether the disease was reproducible and whether both species were susceptible. The virus was subsequently grown five times in CAMs of nine-day-old turkey embryos to increase the titer for the experimental infection. Eighty 9- to 10-week-old female commercial turkeys and eighty 7- to 8-week-old commercial chickens were kept in isolation rooms and received a standard grower diet throughout the experiment. One group of 30 chickens and 30 turkeys were used as negative controls and received 0.2 mL of PBS intratracheally. Egg infective dose (EID₅₀) based on pock formation was 0.2×10^4 (Reed and Muench, 1938). A 0.2 mL viral inoculum was inoculated in each group of turkeys and chickens intratracheally. On post-inoculation (pi) days 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 and 20, five randomly selected infected birds (chickens and turkeys) and three control birds were killed in accordance with accepted veterinary practices, and their tracheas were individually collected and analyzed. Birds were examined daily for the presence of clinical signs. Samples were prepared from the tracheas as described above and were inoculated into the CAM of the respective species eggs for virus recovery. Some of the pocks were further analyzed under

electron microscopy. The tracheal samples were also tested for the presence of virus DNA by nested-PCR and virus isolation in fibroblast cell cultures, and sections of the medial portion of the tracheas were examined by histopathology.

2.5. Isolation in fibroblast cell culture

Primary fibroblast cell cultures were prepared from nine-day-old chicken and turkey embryos. The cells were grown into 96 well plates at 37°C, using an initial concentration of 7×10^4 cells/well in Eagle's minimal essential medium (E-MEM) with 200 IU/mL of penicillin, 20 mg/mL of Streptomycin and supplemented with 5% fetal calf serum. Monolayers were grown to 90% of cell confluence and were inoculated with scraped tracheal supernatants from experimentally infected turkeys and chickens for virus isolation with four repetitions. Adsorption was allowed to occur for 40 minutes at 37°C, and medium with 2% of fetal calf serum was completed to 200 µL. The plates were incubated at 37°C in a CO₂ incubator. The cells were monitored daily during 96 hours for the development of viral cytopathic effect (CPE) using an inverted microscope (Carl Zeiss, Germany).

2.6. Indirect immunofluorescence

Monolayers of chicken and turkey embryo fibroblast cells were inoculated with the scraped tracheal supernatants of experimentally infected chickens and turkeys. After incubation for 24 h at 37°C, the cell monolayers were fixed with methanol and acetone (1:1) for 10 minutes at 4°C. A monoclonal antibody for ILTV gC (Veits et al., 2003) (BFAV Insel Riems, Germany) was diluted (1:100) in PBS, pH 8.5, and subsequently incubated with the cells for 1 hour. Fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugated rabbit anti-mouse IgG antibodies (DAKO, Germany) was diluted (1:80) in PBS, pH 8.5, and incubated with the cells for one hour. After each step, the cell monolayers were washed three times for five minutes with PBS, pH 8.5.

The stained cells were examined with a fluorescence microscope (Carl Zeiss, Germany, 200X).

2.7. Histopathology

A transverse medial section of each trachea from experimentally infected chickens and turkeys was fixed in 10% formalin and embedded in paraffin. The cross-sections were stained with hematoxylin and eosin for light microscopic analysis to detect intranuclear inclusion bodies and histological changes.

2.8. Electron micrographs

The pocks produced by inoculation of the LVV06BR turkey isolate and the vaccine sample in CAMs were cut off, centrifuged and fixed with PBS-1% glutaraldehyde. One drop of each sample was applied to collodium-carbon coated grids and stained with 2% phosphotungstic acid (PTA), pH 7.2, and was examined under transmission electron microscopy (Zeiss-900, Carl Zeiss, Germany) for virus morphology characterization.

3. Results

3.1. Field samples

The presence of viral DNA was confirmed in at least one pool of field tracheal turkey samples from each flock producing a fragment of 647 bp. GenBank accession numbers EF552574; EF552576; EF552577; and EF552579 were assigned to the sequenced fragments (Table 1). All sequenced amplification products and the vaccine (GenBank accession number EF552581) showed 100% nucleotide similarity with the 632 strain (Keeler et al., 1991). The

real-time PCR for detection of Marek's disease viruses and the PCR for detection of avian leukosis virus, reovirus and avipoxvirus were negative.

The electron micrographs of the vaccine and LVV06BR samples (Figure 1) under transmission electron microscopy revealed characteristic herpesvirus particles.

3.2. Experimental infection

Turkeys and chickens experimentally infected with ILTV obtained from turkeys showed mild respiratory signs that began 48 hours pi. Turkeys showed depression and dyspnea beginning on day eight pi, and the infected chickens showed less pronounced respiratory signs from day six to day 16 pi. One of the inoculated chickens died on day 12 pi, and examination showed a hyperemic trachea and exudate. Gross findings were mild hyperemia and mucus secretion that were observed in tracheas from day six to ten pi. After this acute phase, no respiratory signs were observed after 16 days pi. On day six and eight pi, virus isolation on CAM and nested-PCR were positive for ILTV in both species. Nested-PCR and virus isolation detected the virus from day 2 until day 20 pi in both species.

Virus isolation in fibroblast cell cultures of turkey embryos was positive in 84% of the samples from turkeys and in 75% of the samples from chickens. Virus isolation in fibroblast cell of chicken embryos was positive in 70% of the chicken samples and 84% of the turkey samples. CPE was observed earlier in fibroblast cell cultures of chicken embryos (18-24 h) than in turkey fibroblast cell cultures (24-36 h). No control birds had abnormal respiratory signs or lesions, and the virus was not detected in any samples. The indirect immunofluorescence technique was able to detect virus in the vaccine and field samples (Table 2).

Histopathological examination detected inclusion bodies in some of the experimentally infected tracheal samples. Microscopically, lesions in turkey tracheas were less severe than in chickens. Tracheas from experimentally infected turkeys displayed only mononuclear infiltration and necrosis. Gross findings in the tracheas included hyperemia and desquamation of the lumen. Mixed inflammatory cell infiltration, syncytial cells and eosinophilic intranuclear inclusion bodies were also found. Intranuclear inclusion bodies were only found in two chicken epithelial tracheal cells on days eight and ten pi (Figure 2). On day twelve pi, the histological lesions were not characteristic, and only necrosis was seen.

4. Discussion

Only chickens and pheasants have been described as natural hosts for ILTV so far (Guy and Bagust, 2003). Although turkeys do not seem to be infected unless experimentally challenged (Winterfield and So, 1968), some respiratory signs compatible with ILT have been observed in commercial turkey operations in Brazil. In this study, the natural ILTV infections in different commercial turkey flocks was confirmed by nested-PCR, electron microscopy, virus isolation in CAMs, fibroblast cell cultures, and indirect immunofluorescence.

The purpose of sequencing was to confirm the specificity of the amplification products because the ILTV TK gene is conserved within the species (Griffin and Bournell, 1990), which makes it more appropriate for diagnosis than for phylogenetic studies. The sequenced amplification products from turkeys showed 100% similarity with strain 632 (Keller et al., 1991), which indicates that they might have a common origin. Also, this high homology with the sequence retrieved from GenBank precluded the classification of the turkey isolate as a distinct virus species.

The evaluation of the molecular diversity of turkey and chicken strains using less conserved regions of the genome may identify whether turkey strains are in fact chicken strains that may cross infect turkeys or whether they are circulating in the turkey population for a longer period. The experimentally inoculated turkey sample showed characteristic herpesvirus particles under electron microscopy. Since herpesvirus from turkey (HVT) has the same appearance in electron micrograph, this hypothesis was discarded using a specific real-time PCR protocol to detect HVT.

The experimental infection of turkeys and chickens with one strain isolated from turkeys determined that this virus is pathogenic for both species, and may indicate that this virus has a chicken origin. The infected turkeys had mild respiratory signs, such as swelling of the infra-orbital sinuses, nasal discharge and mild tracheitis. The infected chickens had less pronounced and earlier respiratory signs. The turkey isolate appears to be of low pathogenicity and to cause mild respiratory signs in experimentally infected turkeys and chickens. Clinical signs were also not observed after seven days pi in chickens experimentally infected with a low pathogenic ILTV strain (Sellers et al., 2004).

Nested-PCR and virus isolation in fibroblast cultures from experimentally inoculated chickens and turkeys were more sensitive than isolation in embryonated eggs to detect ILTV. Abbas and Andreasen (1996) reported that PCR was less sensitive than virus isolation, but more sensitive than histopathology. Virus isolation requires infectious viral particles, whereas PCR requires ILTV DNA. Therefore, PCR would be expected to have at least the same sensitivity as virus isolation. Nested-PCR showed to be a rapid and sensitive technique for ILTV diagnosis.

The findings of indirect immunofluorescence in fibroblast monolayers with CPE confirm its association with the presence of ILTV. Although fibroblast cell cultures of chicken embryos

were a sensitive method to detect ILTV when compared with embryonated eggs in our study, they were previously described as poor substrates for ILTV propagation (Schnitzlein et al., 1994). Other pathogens can induce the pock lesions in the CAM used for detection of ILTV after the primary isolation and experimental infection. Avian leukosis virus, reovirus and avipoxvirus were not detected by the PCR protocols used in these samples, what turns them unlikely to be the cause of the pocks.

Histopathological findings and indirect immunofluorescence confirmed the presence of ILTV in the experimentally infected turkey samples. Variable degrees of necrotizing tracheitis and infiltration of the mucosa with mixed inflammatory cells were seen in both species, but were more severe in chickens than in turkeys. Eosinophilic intranuclear inclusion bodies were found in two chickens and in none of the turkey tracheal sections. These findings were similar to those reported for the mild form of the disease (Russell and Turner, 1983; Timurkaan et al., 2003). Sellers et al. (2004) also reported the absence of characteristic histopathological lesions, as syncytia or inclusions, in the mild form of the disease. Some authors reported that inclusion bodies are present only in the early stages of infection, that is, one to five days pi (Purcell, 1971; Guy et al., 1991; Vanderkop, 1993) and that histopathologic detection of inclusion bodies was a specific method for the diagnosis of ILTV infection when compared with virus isolation although its sensitivity was lower (Guy et al., 1992). The signs caused by ILTV infection are similar to those caused by other respiratory pathogens of chickens, such as Newcastle disease virus, infectious bronchitis virus, *Mycoplasma* sp., *Haemophilus* sp., and *Ornithobacterium rhinotracheale* (Scholz et al., 1994). *Pasteurella multocida* was also recovered from one of the naturally infected turkey flocks. As *Pasteurella multocida* is a respiratory pathogen of turkeys, the severity of the clinical signs of the naturally infected turkey flocks might be explained by co-infections with other respiratory pathogens. Low

virulent strains can also cause ILT outbreaks under field conditions when combined with predisposing factors, such as stress, co-infection with other respiratory pathogens, and poor ventilation (Han and Kim, 2001).

This study reported on the first detection of ILTV in naturally infected turkey flocks. Further studies should identify the origin of the turkey virus detected in this study and determine the prevalence and economic impact of the disease in the turkey industry. These data will be essential to determine the need to control the disease in commercial turkey flocks.

Acknowledgements

Financial support was provided by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

References

- Abbas, F., Andreasen, J.R., Jackwood, M.W., 1996. Development of a polymerase chain reaction and a nonradioactive DNA probe for infectious laryngotracheitis virus. *Avian Dis.* 40, 56-62.
- Abbas, F., Andreasen, J.R., 1996. Comparison of diagnostic tests for infectious laryngotracheitis. *Avian Dis.* 40, 290-295.
- Beltrão, N., Furian, T.Q., Souza, G.F., Macagnan, M., Fallavena, L.C., Canal, C.W., 2003. Laringotracheitis: Reproducibility of the disease and comparison of diagnostic methods. *Braz. J. Microbiol.* 34, 72-73.
- Beltrão, N., Furian, T.Q., Leão, J.A., Pereira, R.A., Moraes, L.B., Canal, C.W., 2004. Detecção do vírus da laringotraqueíte das galinhas no Brasil. *Pesq. Vet. Bras.* 24 (2), 85-88.
- Chacón, J.L., Villarreal, L.Y., Brandão, P., Ferreira, A.J.P., 2007. Desenvolvimento de uma técnica de PCR para a detecção de infecções clínicas e subclínicas da laringotraqueíte infecciosa. In: In: XX Congresso Latinoamericano de Avicultura, Porto Alegre, Brasil, pp. 181-183.
- Chang, P.W., Yates, V.J., Dardiri, A.H., Fry, D.E., 1960. Some observations on the propagation of infectious laryngotracheitis virus in tissue culture. *Avian Dis.* 4, 384-390.
- Crawshaw, G.J., Boycott, B.R., 1982. Infectious laryngotracheitis in peawfowl and pheasants. *Avian Dis.* 26, 397-401.
- Creelan, J.L., Calvert, V.M., Graham, D.A., McCullough, S.J., 2006. Rapid detection and characterization from field cases of infectious laryngotracheitis virus by real-time polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism. *Avian Pathol.* 35, 173-179.

- Fallavena, L.C.B., Canal, C.W., Salle, C.T.P., Moraes, H.L.S., Rocha, S.L.S., Pereira, R.A., da Silva, A.B., 2002. Presence of avipoxvirus DNA in avian dermal squamous cell carcinoma. *Avian Pathol.* 31, 241-246.
- Fuchs, W., Veits, J., Helferich, D., Granzow, H., Teifke, J.P., Mettenleiter, T.C., 2007. Molecular biology of avian infectious laryngotracheitis virus. *Vet. Res.* 38, 261-279.
- Garcia, M., El-Attrache, J., Riblet, S.M., Lunge, V.R., Fonseca, A.S., Villegas, P., Ikuta, N., 2003. Development and application of reverse transcriptase nested polymerase chain reaction test for the detection of exogenous avian leukosis virus. *Avian Dis.* 47, 41-53.
- Griffin, A.M., Bournnell, M.E.G., 1990. Analysis of the nucleotide sequence of DNA from the region of the thymidine kinase gene of infectious laryngotracheitis virus; potential evolutionary relationships between the herpesvirus subfamilies. *J. Gen. Virol.* 71, 841-850.
- Guy, J.S., Barnes, H.J., Smith, L.G., 1991. Increased virulence of modified-live infectious laryngotracheitis vaccine virus following bird-to bird passage. *Avian Dis.* 35, 348-355.
- Guy, J.S., Barnes, H.J. and Smith, L.G., 1992. Rapid diagnosis of infectious laryngotracheitis using a monoclonal antibody-based immunoperoxidase procedure. *Avian Pathol.* 21, 77-86.
- Guy, J.S., Bagust, T.J., 2003. Laryngotracheitis. In: Barnes, H.J., Fadly, A.M., Glisson, J.R., McDougald, L.R., Swayne, D.E. (Eds.), *Diseases of Poultry*, Iowa State University Press, Ames. pp. 121-134.
- Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids Symp. Ser.* 41, 95-98.

- Han, M.G., Kim, S.J., 2001. Comparison of virulence and restriction endonuclease cleavage patterns of infectious laryngotracheitis viruses isolated in Korea. *Avian Pathol.* 30, 337-344.
- Hughes, C.S., Jones, R.C., 1988. Comparison of cultural methods for primary isolation of infectious laryngotracheitis virus from field materials. *Avian Pathol.* 17, 295-303.
- Islam, A., Harrison, B., Cheetham, B.F., Mahony, T.J., Young, P.L., Walkden-Brown, S.W., 2004. Differential amplification and quantification of Marek's disease viruses using real-time polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods* 119, 103-113.
- Jonhson, M.A., Tyack, S.G., 1995. Molecular evolution of infectious laryngotracheitis virus (ILTV, gallid herpesvirus 1): An ancient example of Alphaherpesviridae? *Vet. Microbiol.* 46, 221-231.
- Keeler, C.L., Kingsley, D.H., Burton, C.R.A., 1991. Identification of the thymidine kinase gene of infectious laryngotracheitis virus. *Avian Dis.* 35, 920-929.
- Purcell, D.A., 1971. The ultrastructural changes produced by infectious laryngotracheitis virus in tracheal epithelium of the fowl. *Res. Vet. Sci.* 12, 455-458.
- Reed, L.J., Muench, H., 1938. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Amer. J. Hyg.* 27, 493-497.
- Russell, R.G., Turner, A.J., 1983. Characterization of infectious laryngotracheitis viruses, antigenic comparison of neutralization and immunization studies. *Can. J. Comp. Med.* 47, 163-171.
- Schnitzlein, W.M., Radzevicius, J., Tripathy, D.N., 1994. Propagation of infectious laryngotracheitis virus in an avian liver cell line. *Avian Dis.* 38, 211-217.

- Scholtz, E., Porter, R.E., Guo, P., 1994. Differential diagnosis of infectious laryngotracheitis from other avian respiratory diseases by a simplified PCR procedure. *J. Virol. Methods* 50, 313-322.
- Sellers, H.S., Garcia, M., Glisson, J.R., Brown, T.P., Sander, J.S., Guy, J.S., 2004. Mild infectious laryngotracheitis in broilers in the southeast. *Avian Dis.* 48, 430-436.
- Silva, G.M.M., Ristow, L.E., 2007. Detecção de anticorpos contra laringotraqueíte infecciosa das aves no Estado de Minas Gerais. In: XX Congresso Latinoamericano de Avicultura, Porto Alegre, Brasil, pp. 110-112.
- Timurkaan, N., Yilmaz, F., Bulut, H., Özer, H., Bolat, Y., 2003. Pathological and immunohistochemical findings in broilers inoculated with low virulent strain of infectious laryngotracheitis virus. *J. Vet. Sci.* 4, 175-180.
- Vanderkop, M.A., 1993. Infectious laryngotracheitis in commercial broiler chickens. *Can. Vet. J.* 34, 183-185.
- Veits, J.; Köllner, B.; Teifke, J.P.; Granzow, H.; Mettenleiter, T.C. and Fuchs, W., 2003. Isolation and characterization of monoclonal antibodies against structural proteins of infectious laryngotracheitis virus. *Avian Dis.* 47, 330-342.
- Villarreal, L.Y.B., Brandão, P.E.B., Chacon, J.L.V., Doretto, L., Ito, N., Gama, N.S., Ishizuka, M.M., Luchese, A., Buchala, F., Astolfi-Ferreira, C.S., Ferreira, A.J.P., 2004. Detection and molecular characterization of infectious laryngotracheitis virus in laying hens in Brazil. *Rev. Bras. Ciênc. Avic.* 6, 253-256.
- Winterfield, R.W., So, I.G., 1968. Susceptibility of turkeys to infectious laryngotracheitis. *Avian Dis.* 12, 191-202.

Table 1

Samples identified by protocol number from Laboratório de Virologia Veterinária (LVV), year of isolation, species from which the samples were collected, and GenBank accession numbers of nucleotide sequences from amplification products.

| Protocol number | Year of isolation | Species | Genbank accession No. |
|------------------------|--------------------------|----------------|------------------------------|
| LVV03BR | 2005 | Turkey | EF552574 |
| LVV06BR | 2002 | Turkey | EF552576 |
| LVV07BR | 2005 | Turkey | EF552577 |
| LVV09BR | 2002 | Turkey | EF552579 |
| vaccine | ----- | Chicken | EF552581 |

Table 2

Time course of the experimental infection of turkeys (T) and chickens (C) showing the number of the five birds collected at each time that displayed respiratory symptoms, or the number of positive birds to ILTV by nested-PCR, virus detection in chicken and turkey embryo fibroblasts and CAMs of embryonated eggs from both species. The last line displays the percentage of positive samples throughout the experiment.

| Days post inoculation | Respiratory Symptoms (dyspnea, depression) | | Detection of virus DNA by nested-PCR | | Detection of virus in chicken embryo fibroblast | | Detection of virus in turkey embryo fibroblast | | Detection of virus in CAMs | |
|---------------------------|--|----|--------------------------------------|----|---|----|--|----|----------------------------|----|
| | T | C | T | C | T | C | T | C | T | C |
| Species | | | | | | | | | | |
| 2 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 4 | 0 | 0 | 3 | 2 | 2 | 3 | 3 | 3 | 0 | 0 |
| 6 | 0 | 1 | 3 | 4 | 5 | 4 | 5 | 4 | 1 | 0 |
| 8 | 1 | 2 | 5 | 5 | 5 | 4 | 5 | 4 | 3 | 2 |
| 10 | 3 | 2 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 3 | 4 |
| 12 | 4 | 3 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 2 | 3 |
| 14 | 5 | 3 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 1 | 2 |
| 16 | 5 | 1 | 4 | 5 | 5 | 3 | 5 | 3 | 1 | 2 |
| 18 | 2 | 0 | 4 | 5 | 5 | 3 | 4 | 3 | 0 | 0 |
| 20 | 0 | 0 | 3 | 2 | 4 | 2 | 4 | 3 | 0 | 0 |
| General percentage | 40 | 24 | 76 | 78 | 84 | 70 | 84 | 75 | 26 | 25 |

Figure captions

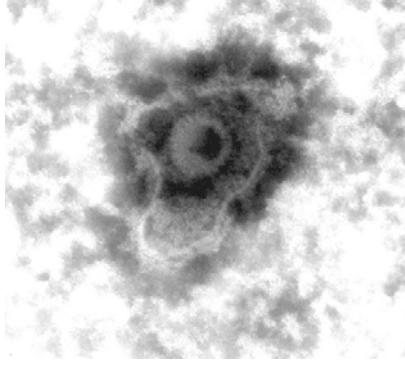


Figure 1: Electron micrograph taken from a pock of a CAM inoculated with LVV06BR turkey sample displaying one characteristic herpesvirus particle.

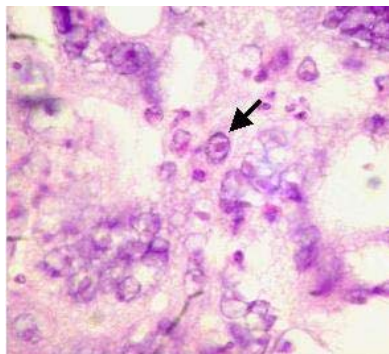


Figure 2: Micrography of a tracheal chicken sample at day 8 pi (40x magnification). The arrow indicates one intranuclear inclusion body.

3.2 Genetic analysis of glycoprotein C and Thymidine kinase genes from Brazilian isolates of infectious laryngotracheitis virus*

* Manuscrito a ser submetido na forma de artigo original no periódico científico Vírus Genes.

**GENETIC ANALYSIS OF GLYCOPROTEIN C AND
THYMIDINE KINASE GENES FROM BRAZILIAN ISOLATES
OF INFECTIOUS LARYNGOTRACHEITIS VIRUS**

Cristiana Portz^{a 1}, Herbert Rech^{a 1}, Nilzane Beltrão^b, Carlos André Lima Rosa^c, Giancarlo
Pasquali^d, Cláudio Wageck Canal^a

^a Laboratório de Virologia, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves, 9090 - Agronomia CEP: 91540-000, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. Telephone: +55 51 3308 6926, Fax: +55 51 3308 7305.

^b Centro de Diagnóstico Veterinário Brasil Sul Ltda, Mercolab, Cascavel, Paraná, Brazil

^c Laboratório de Análises Genéticas-DNA, Centro de Ciências Agroveterinárias, UDESC, Lages, Santa Catarina, Brazil

^d Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia do Instituto de Biociências, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil

¹ Both authors contributed equally to this work.

Running title: laryngotracheitis virus genetic analysis

Key words: Gallid herpesvirus 1, avian laryngotracheitis virus, turkey, chicken, genotyping

To whom proof should be sent: Cláudio Wageck Canal; e-mail: claudio.canal@ufrgs.br

Members of the editorial board as suggested: I. Davidson (Israel) and Y. Shtram (Israel)

Abstract

Infectious laryngotracheitis viruses (ILTV) were isolated from Brazilian chicken and turkey flocks with clinical signs of respiratory disease. Fragments of the thymidine kinase (TK) and glycoprotein C (gC) genes of the ILTV genome were amplified by PCR and sequenced. The sequences from field isolates, a vaccine strain and previously published sequences were compared. The TK and gC genes from Brazilian isolates displayed over than 99% similarity and the nucleotide changes did not interfere in the amino acids characteristics. From these results, is possible to conclude that ILTV Brazilian isolates are closely related between them and with strains from other countries.

Introduction

Infectious laryngotracheitis (ILT) is an acute viral respiratory disease of worldwide distribution that affects growth and egg production, leading to economic losses in the poultry industry [1]. The causative agent is the Gallid herpesvirus 1 or infectious laryngotracheitis virus (ILTV) that is classified in the subfamily *Alphaherpesvirinae* of the family *Herpesviridae* [2]. Susceptible hosts to ILTV infection were restricted to chicken, pheasants and peafowl [4]. Among avian hosts, the herpesviruses also tend to be species specific with respect to susceptibility, pathogenicity and virulence. Turkey infection was described only by experimental infection [5]. ILTV infections of chickens in Brazil were reported based on serological, virological and histopathological tests [3].

The thymidine kinase gene (TK) is located in the unique long genome region (UL23) of the virus and is not essential for virus replication in tissue culture and was described as being associated with virulence and reactivation from the latent state [6]. It has been described as a conserved gene, what turns it more appropriate for diagnosis than for genotyping purposes [13].

The glycoprotein C gene (UL44) is located in the unique long genome region [6], and is either nonessential for replication in vitro [7]. Glycoprotein C, detected in the envelope of purified virions [8], usually plays an important role during initial virus attachment by binding to heparin sulfate chains of proteoglycans at the host cell membrane [9, 10]. The gC gene of BoHV-1 has high degree of variability along its N-terminal region and has often been envisaged as a target for the development of type-differential tests [11].

Comparison of genes between field isolates and the vaccine strain of ILTV can be applied to characterize the strains and to verify the involvement of ILTV vaccine strains in the outbreak of disease.

The present study aimed to sequence and analyze the TK and gC genes from field Brazilian isolates in order to investigate the genetic diversity within these regions and to compare them with a vaccine strain and ILTV field strains, previously published as [13].

Materials and Methods

Samples

Between the years 2002 and 2006 pools of tracheas from fourteen commercial breeders were collected by veterinaries and submitted to our laboratory to be analyzed (Table 1). One of the isolates (LVV08BR) was collected from free-range chickens. Turkey isolates were obtained from flocks with approximately 100 days old exhibiting respiratory signs including nasal discharge, depression, dyspnea and tracheitis. The isolates were collected from chickens displaying a mild to severe respiratory disease with hyperemic and hemorrhagic tracheas. A vaccine strain (Solvay Animal Health, Inc., IA, USA) was used as a positive control and was either sequenced. The vaccine was imported in 1994 for research purposes with permission of the Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Sequences comprising the same genome regions found in GenBank, from TK genome region, with the accession numbers S83714, D00565, DQ522949, DQ785400, DQ786401, and from gC genome region, U06635, were compared with Brazilian isolates.

Laboratory procedures, viral DNA amplification and sequencing

Each pool of tracheas was slit longitudinally and, using a scalpel blade, the epithelium was scrapped off together with associated mucus. The scrapings were placed in a total of 1.5 mL of phosphate buffered saline (PBS) with antibiotics. The mixture was vigorously vortexed and centrifuged to clarify the supernatant. Virus DNA extraction was performed directly from the clinical samples by phenol-chloroform procedure as described previously [3]. The external primers were previously described [14]. The internal primers

(5' ACGATGACTCCGACTTTC 3' and 5' CGTTGGAGGTAGGTGGTA 3') were selected to amplify a 647bp fragment.

The PCR reaction mixture contained 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 200 μM dNTP of each nucleotide, 0.5 μM of each primer, 1 unit of Taq DNA polymerase (Cbiot, Porto Alegre, Brazil) and 1 μl of DNA sample in 25 μl of reaction final volume. The nested-PCR cycling program included 30 cycles of denaturing at 95°C for 1 minute, annealing at 50°C for 1 minute, extension at 72°C for 1.5 minutes and a final extension cycle at 72°C for 10 minutes.

In order, two set of primers were selected based on a published DNA sequence of the gC gene (GenBank accession number U06635). The selected primers were an external primer pair 5'-GAAACTGCCTTCGCCGAGC-3' (bases 300 to 318, sense) and 5'-GCCAAGCGCTTCAACACTTAAGT-3' (bases 1262 to 1284, antisense) and an internal primer pair 5'-GATCTACATTCCACCGAGCAACCG-3' (bases 351 to 374, sense) and 5'-ATGGTGGGTAAATTCCATCTTCACC-3' (bases 1036 to 1060, antisense). The PCR reaction mixture contained 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 200 μM dNTP of each nucleotide, 0.5 μM of each primer, 1 unit of Taq DNA polymerase (Cbiot, Porto Alegre, Brazil) and 1 μl of DNA sample in 25 μl of reaction volume. The condition for PCR reaction was: 1 cycle of 95°C for 5 min, followed by 35 cycles of 95°C for 1 minutes, 58°C for 1 minutes and 72°C for 1.5 minutes and a final extension of 72°C for 10 minutes. The internal amplification product was 709 bp. All amplifications were performed with a Perkin Elmer GenAmp PCR System 2400 thermocycler. The 647 bp amplification products from TK gene and the 709 bp amplification products from the gC

gene were purified with GFX DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Biosciences, Sweden).

Both strands were sequenced in a reaction containing 80 ng of target DNA and 5 pmol of forward and reverse primers. Product sequences were resolved on a MegaBACE automatic sequencer (GE Healthcare, Canadian). The obtained nucleotides sequences were assembled and analyzed using the BioEdit software package [15] and the NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) analysis tools. The phylogenetic relationship between these sequences was performed by Mega3 [16].

Results

Analysis of the nucleotide and amino acid sequences of the TK gene

The resulting sequences were assembled with GenBank accession numbers assigned on Table 1. Two groups of field isolates from TK gene were performed considering three nucleotides changes. The four turkey isolates (LVV03BR, LVV06BR, LVV07BR, LVV09BR) were included in the group 1 with other chicken isolates (LVV04BR, LVV08BR, LVV11BR, LVV13BR) and the vaccine strain. The group 2 comprises only chicken isolates LVV01BR, LVV02BR, LVV05BR, LVV10BR. The nucleotide sequences of TK gene of ILTV from group 1 were highly similar to the reference strains (S83714, DQ522949 and D00565), the vaccine strain, all the turkey field isolates (LVV03, LVV06, LVV07, LVV09), free-range chicken field isolates (LVV08) and three chicken field isolates (LVV04, LVV11, LVV13). The reference strains from TK gene were assembled with the sequences from group 1 and showed three different nucleotides from the TK region analyzed comparing with group 2 ($T^{283} \rightarrow C$, $G^{301} \rightarrow A$ and $A^{754} \rightarrow C$). These nucleotide differences did not change the characteristic of the deduced amino acids. The reference sequences DQ786400 and DQ786401 assembled in group 2 have only one change of nucleotide at position 754 and none of the sequences displayed three additional nucleotides at positions (C^{462} , G^{463} , C^{469}) as showed by the reference strain D00565.

Analysis of the nucleotide and amino acid sequences of the gC gene

A turkey field isolate (LVV06BR), four chicken field isolates (LVV11BR, LVV13BR, LVV14BR, LVV15BR), and the vaccine strain amplified a fragment of 709 bp from the glycoprotein C region by nested-PCR. The nucleotide sequences were analyzed and aligned with the homologous sequence from the strain 632 (GenBank accession number U06635). The nucleotide and deduced amino acid sequences differences are summarized in Table 1.

All the sequences displayed 100% homology with the sequence U06635, with exception of the sample (LVV13BR). The 632 strain (U06635) sequence displayed three different nucleotides from the gC region analyzed ($C^{612} \rightarrow T$, $G^{652} \rightarrow A$ e $A^{900} \rightarrow G$). Furthermore, the other nucleotide mutations were localized before the start codon and did not cause alteration in translation.

Discussion

In the present study, the genetic diversity of ILTV isolates that circulate in Brazilian commercial chicken and turkey flocks was analyzed by amplification and sequencing of the thymidine kinase (TK) and glycoprotein C (gC) genome regions. All the tracheal isolates analyzed came from regions with high density of commercial breeder flocks in Brazil suggesting that the disease is present between the regions. Free-range chicken infected with ILTV also determine an important factor to the spreading of the disease through the poultry industry. Antibodies to ILTV were also detected in free-range chickens with or without clinical signs at Minas Gerais State, Brazil [17]. The field turkey sequences from the two regions displayed high similarity with chicken isolates and vaccine strain. It is difficult to assess whether the ILTV is being reintroduced on the farm after clean out and a sporadic outbreaks occur. Also exist the suspect that low pathogenic strains of ILTV, which caused weak clinical signs, could cause the disease in the field conditions by a combination of specific factors such as co-infection of respiratory diseases [12].

Through the results, the nucleotide sequence analysis from the TK and gC regions displayed high similarity with the related published sequences. The sequences of the TK gene from the vaccine strain, field isolates from group 1 and the reference strains displayed 100% of similarity what does not rule out that the field isolates could be originated from a vaccine strain through the reversion of virulence already described by other authors [18, 19]. Other genes than the two described in the present work can be involved with virulence, such as ribonucleotide reductase, glycoprotein E and glycoprotein I [20].

The nucleotides changes analyzed from TK and gC regions did not interfere in amino acids characteristics. In addition, the TK genome region evaluated was described as highly conserved among the avian herpesvirus [13]. Despite the high degree of similarity between

the sequences from TK gene, the gC gene was chosen because it has been described as less conserved between BoHV-1 strains. However, gC gene from ILTV is not too much studied, the alignment of the turkey and chicken field isolates displayed high similarity with reference strains. A comparison of the TK gene sequence determined from strain 632 [13] with that subsequently published for the Thorne strain of ILTV reveals only one area of divergence. This difference corresponds to a change in the primary amino acid sequence from Arginine-Arginine to Proline- Valine at amino acid position 101 that can induce changes in virus virulence [13].

From these results, the evaluation of molecular diversity of the Brazilian field isolates could also involve the study of other regions of the ILTV genome. In order, other techniques as RFLP-PCR are largely used to compare field with vaccine strains, but in Brazil the vaccine practice is only allowed in outbreaks [12, 22-24] and turn difficult to relate the involvement of the vaccine strains with the field strains diagnosed by research groups in different States of Brazil [3, 17, 25]. Also, it was difficult to purify quality viral DNA [22]. This diagnostics tools are important to improve sanitary programs and establish a continuous program to determine the incidence, prevalence, the economic impact of this disease in the poultry industry.

Acknowledgements

The financial support of this study was provided by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

References

1. Bagust T.J., Jones R.C., and Guy J.S., *Revue Scientifique Et Technique De L Office International Des Epizooties* 19, 483-492, 2000.
2. Roizman B., Carmichael L.E., Deinhardt F., Dethe G., Nahmias A.J., Plowright W., Rapp F., Sheldrick P., Takahashi M., and Wolf K., *Intervirology* 16, 201-217, 1981.
3. Beltrao N., Furian T.Q., Leao J.A., Pereira R.A., de Moraes L.B., and Canal C.W., *Pesquisa Veterinaria Brasileira* 24, 85-88, 2004.
4. Crawshaw G.J., and Boycott B.R., *Avian Diseases* 26, 397-401, 1982.
5. Winterfi.Rw, and So I.G., *Avian Diseases* 12, 191-&, 1968.
6. Ziemann K., Mettenleiter T.C., and Fuchs W., *Journal of virology* 72, 847-852, 1998.
7. Osterrieder N., *Virus research* 59, 165-177, 1999.
8. Veits J., Kollner B., Teifke J.P., Granzow H., Mettenleiter T.C., and Fuchs W., *Avian Diseases* 47, 330-342, 2003.
9. Eisenberg R.J., Deleon M.P., Friedman H.M., Fries L.F., Frank M.M., Hastings J.C., and Cohen G.H., *Microbial Pathogenesis* 3, 423-435, 1987.
10. Friedman H.M., Cohen G.H., Eisenberg R.J., Seidel C.A., and Cines D.B., *Nature* 309, 633-635, 1984.
11. Claus P., Alfieri A.F., Folgueras-Flatschart A.V., Wosiacki S.R., Medici K.C., and Alfieri A.A., *Journal of Virological Methods* 128, 183-188, 2005.
12. Han M.G., and Kim S.J., *Veterinary Microbiology* 83, 321-331, 2001.
13. Keeler C.L., Kingsley D.H., and Burton C.R.A., *Avian Diseases* 35, 920-929, 1991.
14. Abbas F., and Andreasen J.R., *Avian Diseases* 40, 290-295, 1996.
15. Hall T.A., *Nucleic Acids Symp Ser* 41, 95-98, 1999.
16. Kumar S., Tamura K., and Nei M., *Brief Bioinform* 5, 150-163, 2004.
17. Silva G.M.M., and Ristow L.E. Detecção de anticorpos contra Laringotraqueite infecciosa das aves no Estado de Minas Gerais. XX Congresso Latinoamericano de Avicultura, Brasil, 2007, pp. 110-112.
18. Andreasen J.R., Glisson J.R., and Villegas P., *Avian Diseases* 34, 646-656, 1990.
19. Guy J.S., Barnes H.J., and Morgan L.M., *Avian Dis* 34, 106-113, 1990.

20. Schnitzlein W.M., Winans R., Ellsworth S., and Tripathy D.N., *Virology* 209, 304-314, 1995.
21. Li H., Liu S., and Kong X., *Virus Genes* 33, 221-227, 2006.
22. Oldoni I., and Garcia M., *Avian Pathol* 36, 167-176, 2007.
23. Chang P.C., Lee Y.L., Shien J.H., and Shieh H.K., *Journal of Virological Methods* 66, 179-186, 1997.
24. Garcia M., and Riblet S.M., *Avian Diseases* 45, 558-566, 2001.
25. Vargas R.E.S. Laringotraqueíte infecciosa das aves; Estudo epidemiológico em plantéis avícolas no Estado do Rio Grande do Sul Centro de Diagnóstico de Patologia Aviária. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2000, p. 104.

Table 1 - Identification of the field isolates from chicken and turkey with protocol number from Laboratório de Virologia Veterinária (LVV), gene analysed, species from which the samples were collected, GenBank accession numbers of the nucleotide sequences and the differences in the nucleotide and amino acid sequences of the TK and gC genes from field and reference strains.

| Protocol numbers | Genes analyzed | Species | Genbank accession numbers | ILTV strains differences | Position of nucleotide | Nucleotide mutation | Amino acid mutation |
|---------------------|----------------|--------------------|---------------------------|--------------------------|------------------------|---------------------|---------------------|
| LVV03BR | | Turkey | EF552574 | | | | |
| LVV04BR | | Chicken | EF552575 | | | | |
| LVV06BR | | Turkey | EF552576 | | | | |
| LVV07BR | | Turkey | EF552577 | | | | |
| LVV08BR | | Free-range chicken | EF552578 | | 283 | C → T | G*** |
| LVV09BR | TK gene | Turkey | EF552579 | Group 1 | 301 | A → G | K*** |
| LVV11BR | | Chicken | EF552580 | | 754 | C → A | A*** |
| LVV13BR | | Chicken | EF552582 | | | | |
| Vaccine | | Chicken | EF552581 | | | | |
| Keeler et al. | | Chicken | S83714 | | | | |
| Chen et al. | | Chicken | DQ522949 | | | | |
| Griffin & Bournnell | | Chicken | D00565 | | | | |
| LVV01BR | | Chicken | EF552583 | | | | |
| LVV02BR | | Chicken | EF552584 | | | | |
| LVV05BR | TK gene | Chicken | EF552585 | Group 2 | 283 | T → C | G*** |
| LVV10BR | | Chicken | EF552586 | | 301 | G → A | K*** |
| Chacon et al. | | Chicken | DQ786400 | | 754 | A → C | A*** |
| Chacon et al. | | Chicken | DQ786401 | | | | |
| LVV06BR | | Turkey | EU281337 | | | | |
| LVV11BR | | Chicken | EU281338 | | 612 | C → T | ** |
| Vaccine | | Chicken | EU281339 | LVV13BR | 652 | G → A | ** |
| LVV13BR | gC | Chicken | EU281340 | | 900 | A → G | R*** |
| LVV14BR | | Chicken | EU281341 | | | | |
| LVV15BR | | Chicken | EU281342 | | | | |
| Keeler et al. | | Chicken | U06632 | | | | |

DQ786400 and DQ786401 sequences from group 2 have only one change of nucleotide at position 754.

** This region of the gene is not translated.

*** No amino acid changes.

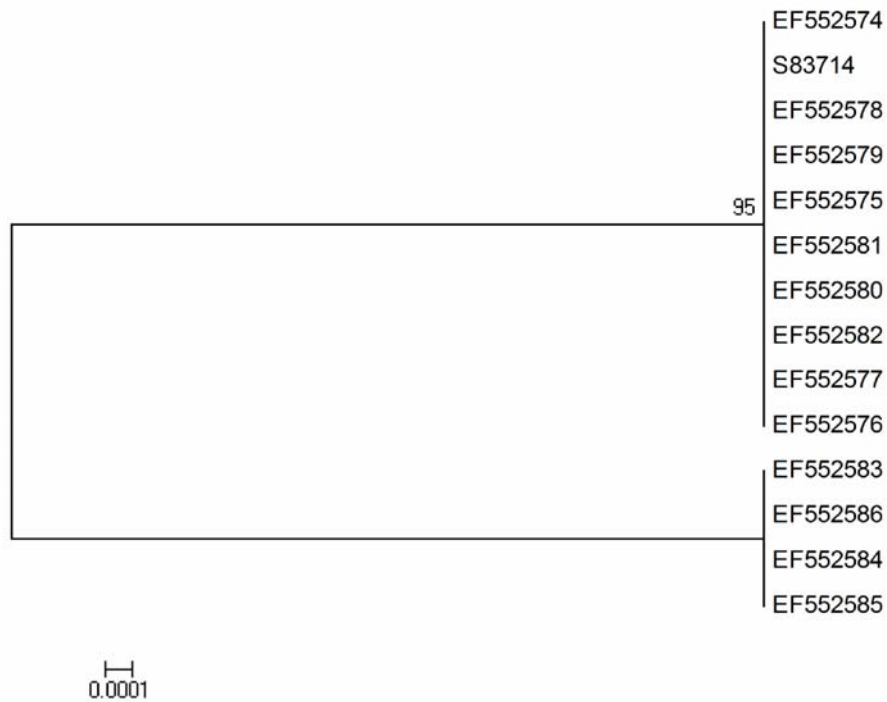


Figure 1: Phylogenetic tree based on neighbor-joining method for the nucleotide sequences of the TK gene of ILTV isolates (EF552574, EF552578, EF552579, EF552575, EF552581, EF552580, EF552582, EF552577, EF552576, EF552583, EF552586, EF552584, EF552585) and the reference strain S83714.

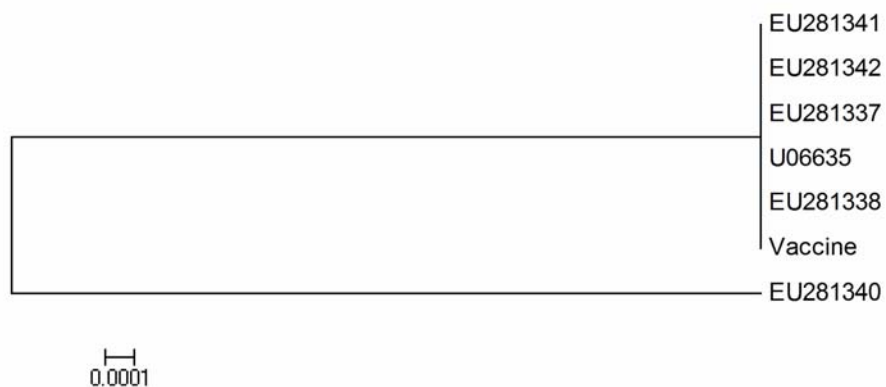


Figure 2: Phylogenetic tree based on neighbor-joining method for the nucleotide sequences of the gC gene of ILTV isolates (EU281341, EU281342, EU281337, EU281338, EU281340), reference strain U06635 and the vaccine strain.

3.3 Comparison of different cell cultures for replication of infectious laryngotracheitis virus from chickens*

* Manuscrito submetido na forma de artigo original ao periódico científico *Acta Scientiae Veterinariae*.

**COMPARISON OF DIFFERENT CELL CULTURES FOR REPLICATION OF
INFECTIOUS LARYNGOTRACHEITIS VIRUS FROM CHICKENS**

Comparação de diferentes cultivos celulares para a replicação do vírus da laringotraqueíte
infecciosa das galinhas

Cristiana Portz¹; Laura Lopes de Almeida¹; Alfredo Bianco Júnior¹; Herbet Reck¹;

Ana Cláudia Franco² & Cláudio Wageck Canal¹

¹Laboratório de Virologia, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Brazil

²Laboratório de Virologia, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Brazil

Corresponding author: claudio.canal@ufrgs.br

ABSTRACT

The propagation of infectious laryngotracheitis virus (ILTV) has been described using primary cell cultures derived from chicken embryo liver and kidney or embryonated eggs, but these cultures use Specific Pathogen Free (SPF) eggs that are expensive and spend time. Since cell line cultures are easier to maintain in laboratory conditions the growth of ILTV was evaluated in five different cell cultures: chicken embryo related cells (CER), a cell hybrid derived from chicken embryo fibroblasts cells and BHK-21; Vero, from African green monkey kidney cells; HD11, a chicken macrophage cell line; CEC-32, an avian fibroblast cell line and a primary cell culture of chicken embryo fibroblasts (CEF). Cytophatic effect was observed until 96 hours following inoculation and the presence of the viral DNA was performed by PCR. The HD11 and CEC-32 cell lines did not support the virus growth but CEF and Vero, as already described were permissive cultures for propagation of ILTV. The results also showed that the CER cell line can be used for primary isolation and replication of ILTV.

Keywords: Infectious laryngotracheitis virus, virus isolation, cell culture, Gallid herpesvirus 1, diagnosis.

RESUMO

A propagação do vírus da laringotraqueíte infecciosa tem sido descrita usando culturas de células primárias derivadas de fígado e rim de embrião de galinha ou ovos embrionados, entretanto, essas culturas necessitam de ovos livres de patógenos específicos (SPF) que tomam tempo e custam caro. Desta maneira, culturas de células de linhagem são mais fáceis de manter em laboratório e conduzir os experimentos. A propagação do ILTV foi avaliada em cinco diferentes cultivos celulares: chicken embryo related cells (CER), que é uma linhagem híbrida derivada de fibroblasto de embrião de galinha e BHK-21; a linhagem Vero, derivada de células de rim de macaco verde africano; HD11, uma linhagem de células de macrófagos de galinha; CEC-32, uma linhagem de fibroblasto de ave e um cultivo primário de fibroblasto de embrião de galinha (CEF). O efeito citopático foi observado até 96 horas pós-inoculação e a presença do DNA viral foi confirmada por PCR. Os cultivos de linhagem HD11 e CEC-32 não suportaram a propagação viral e os cultivos celulares de CEF e Vero, como previamente descrito, mostraram ser permissíveis à replicação do ILTV. Os resultados também demonstram que a linhagem celular CER também pode ser utilizada para o isolamento e replicação do ILTV.

Descritores: Vírus da laringotraqueíte infecciosa, isolamento viral, cultivos celulares, Gallid herpesvirus 1, diagnóstico.

INTRODUCTION

Infectious laryngotracheitis virus (ILTV) is classified as a member of the family *Herpesviridae* in the subfamily *Alphaherpesvirinae*. The virus is taxonomically identified as Gallid herpesvirus 1 (GaHV-1), genus *Iltovirus*, with genome is a linear double-stranded DNA with 155 kb [10, 13]. ILTV infection is characterized by signs of respiratory distress in chickens that may result in significant mortality and loss of productivity. The first report of ILTV in Brazil dates from 1974 and since then some cases were reported based on serological, virological and histopathological tests [2, 9, 19, 21]. The isolation of ILTV from field material has been described using embryonated chicken eggs inoculated in the chorioallantoic membrane (CAM) [12], and primary cell cultures derived from chicken embryo liver (CEL), chicken embryo kidney (CEK), chicken embryo fibroblast (CEF) and a cell line derived from an African green monkey kidney cells (Vero) [10]. However, due to the short span, cost and the time spent to produce primary cell cultures, an option to enhance the number of viable viral particles achieved after virus passage in cell culture and to increase the sensitivity of virus isolation, may be the use of a continuous cell line. Such cell lines are especially relevant to many laboratory procedures that require high virus titers, such as antigen production for diagnostic tests, animal inoculation experiments and vaccine production. The purpose of the present study was to compare the susceptibility of different cell lines for ILTV propagation.

MATERIALS AND METHODS

Two ILTV strains were tested: LVV13BR was isolated from chickens of São Paulo State (Brazil) and LVV06BR that was isolated from turkeys of the South Region of Brazil. The cells tested were a primary cell culture of chicken embryo fibroblasts (CEF) [12], that was compared with four cell lines: chicken embryo related cells (CER), a cell hybrid derived from chicken embryo fibroblasts cells and BHK-21 (Baby hamster kidney cells, clone 21, ATCC CCL-10) [20], an avian fibroblast cell line (HD11) [3], an avian fibroblast cell culture, CEC-32 [23] and a mammalian cell line derived from African green monkey kidney cells (Vero) [12]. The cells were grown into 96 well plates at 37⁰C, using an initial concentration of 5.0 x 10⁵ cells/mL in Eagle`s minimal essential medium (E-MEM) with 200 IU/mL of Penicillin, Streptomycin and supplemented with 5% fetal calf serum. Both chicken and turkey virus strains were isolated directly from tracheal clinical samples and were grown at least three times in the chorioallantoic membrane (CAM) of embryonated eggs from both species, to increase the titer of the viruses. CAMs were examined for pock formation (opaque plaques on the CAM) at five to seven days post inoculation. Egg infective dose (EID₅₀/mL) based on pock formation was 0.2 x 10⁴ [16].

Monolayers were grown to 90% of cell confluence and were inoculated with 50 µL of each viral isolate, with eight repetitions. Adsorption was allowed for 40 minutes at 37⁰C and medium with 2% of fetal calf serum was completed to 200 µL. The plates were incubated at 37⁰C with 5% CO₂. The cells were observed daily during 96 hours for the development of viral cytopathic effect (CPE) using an inverted microscope (Carl-Zeiss, West Germany). The plates were frozen at -70⁰C until the next passage of the virus. Harvested cultures were centrifuged at 1000 g for 10 minutes and stored at -70⁰C in small

aliquots until required. After three passages in each cell line, supernatants were titrated in 96 well plates by the Reed & Muench method expressed as the \log_{10} tissue culture infective dose per 50 μL ($\text{TCID}_{50}/50 \mu\text{L}$).

After each of the three passages, virus DNA was extracted by the phenol-chloroform method [1]. Two pair of primers were used in a nested-PCR that targets the TK gene of ILTV and amplified a fragment of 647 bp [2].

Statistical analysis were performed using Tukey's test with 1% of significance and analysis of variance (ANOVA). The analysis were performed using the software package SAS[®] (Version 5 Ed. SAS Inst. Inc., Cary, N.C.).

RESULTS

CER and Vero cell lines were able to replicate ILTV producing viral titers that were not statistically different (Table 1). Primary cell culture of chicken embryo fibroblasts (CEF) was the more susceptible to infection with ILTV producing the highest viral titer ($10^5/50$ μ L). In contrast, HD11 and CEC-32 cell lines did not produce detectable virus DNA after three passages. The cell lines Vero, CER and CEF were able to replicate both strains of ILTV. The predominant cytopathic effect observed was an initial rounding followed by death of the cells. The CPE in CER and CEF cells was observed 24 hours after infection. In addition, the Vero cell line displayed CPE only after 48 or 72 hours of infection.

DISCUSSION

ILTV has been propagated in a variety of primary cell cultures from chicken embryo liver and chicken embryo kidney cells being the preferred substrates [12]. In the present study, one primary and four cell lines were tested to analyze the replication of ILTV. The cell lines HD11 and CEC-32 were not able to replicate ILTV. CEF and Vero cells were efficient to replicate ILTV, although they produced low viral titers as previously described [10, 11]. The CER cell line was never tested before for the susceptibility to ILTV, however, it was characterized before as susceptible for infectious bursal diseases virus, rabies virus and other viruses from mammals [5, 6, 7, 20]. It showed to be a permissive cell line to replicate ILTV generating low viral titers and was able to produce CPE 24 hours after virus inoculation. Therefore, CEF, Vero and CER cell cultures displayed to be poor substrates for ILTV propagation, but all of them were able to replicate both turkey and chicken strains of ILTV, although CEF and Vero were considered to be poor substrates for ILTV propagation [12, 18]. The macrophage cell line (HD11) was not able to replicate ILTV, although a previous study showed that macrophage cultures were susceptible to ILTV infection, but replication of most ILTV strains examined was restricted [4]. The cell line CEC-32 is closely related to CEF cell culture, but it seems to be derived from quail [23], a species that is not described as susceptible to ILTV infection.

The use of two different strains is based on the knowledge that some strains are difficult to replicate in cells that the majority of the strains growth readily. For example, a low pathogenic strain of ILTV isolated from poultry companies at southeast of United States was not able to replicate in primary chicken embryo liver or kidney cells as well as several continuous cell lines [18]. Presumably, erroneous structures as formation of viral

particles without nucleocapsids, are in part responsible for the low titers of ILTV in tissue culture, which rarely exceeds one infection unit per cell [8]. In these cases, the PCR technique is a very important means of detection, since it can be used to test samples from suspected birds prior to the inoculation in embryonated eggs or cell cultures and it allows the detection of infection in a very early phase when compared with serological reactions [15].

Although primary cell cultures are still used as hosts for ILTV, they cannot be maintained *in vitro* for a long time and Specific Pathogen Free (SPF) eggs are very expensive [12]. However, the experiments at our laboratory showed that replication of ILTV in chorioallantoic membranes (CAM) produce higher viral titers. The replication cycle of ILTV has only been poorly investigated up to now and the knowledge of fundamental mechanisms of virus replication are still hampered by the lack of suitable cell lines for efficient *in vitro* propagation and manipulation [8].

This is the first report that compares the viral replication of ILTV in HD11, CER and CEC-32 cell lines. Specially, CER cell line may be easily maintained in the laboratory and is susceptible to a wide spectrum of different viruses. Nevertheless, further experiments with other strains of ILTV and optimal cell cultures might also contribute to the establishment of a suitable cell line for ILTV propagation and diagnosis.

CONCLUSIONS

The cell lines CEC-32 and HD11 were not able to replicate ILTV. The cell cultures CEF and Vero, as already shown, supported ILTV propagation. The results indicate that the CER cell line can be used for primary isolation and replication of ILTV.

Acknowledgements

Financial support was provided by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

REFERENCES

- 1 **Abbas, F. & Andreasen, J.R. 1996.** Comparison of diagnostic tests for infectious laryngotracheitis. *Avian Diseases*, 40: 290-295.
- 2 **Beltrão, N., Furian, T.Q., Leão, J.A., Pereira, R.A., Moraes, L. & Canal, C.W. 2004.** Detecção do vírus da laringotracheíte das galinhas no Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 24: 85-88.
- 3 **Beug, H., Von Kirchbach, A., Döderlein, G. & Francois, J. 1979.** Chicken hematopoietic cells transformed by seven strains of defective avian leukemia viruses display three distinct phenotypes of differentiation. *Cell*, 18: 375-390.
- 4 **Calnek, B.W., Fahey, K.J. & Bagust, T.J. 1986.** In vitro infection studies with infectious laryngotracheitis virus. *Avian Diseases*, 30: 327-336.
- 5 **Cardoso, T.C., Rahal, P., Pilz, D., Teixeira, M.C.B. & Arns, C.W. 2000.** Replication of classical infectious bursal disease virus in the chicken embryo related cell line. *Avian Pathology*, 29: 213-217.
- 6 **Cardoso, T.C., Silva, L.H., Albas, A., Ferreira, H.L. & Perri, S.H. 2004.** Rabies neutralizing antibody detection by indirect immunoperoxidase serum neutralization assay performed on chicken embryo related cell line. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 99: 531-534.
- 7 **El Karamany, R.M., Imam, I.Z., Fraid, A.H. & Saber, M.S. 1979.** Susceptibility of CER cell line to Rift Valley fever virus. *Journal of Egypt Public Health Association*, 54: 105-114.

- 8 Fuchs, W., Veits, J., Helferich, D., Granzow, H., Teifke, J.P. & Mettenleiter, T.C. 2007.** Molecular biology of avian infectious laryngotracheitis virus. *Veterinary Research*, 38: 261-279.
- 9 Gama, N. 2004.** Laringotraqueite: o caso brasileiro. p.85-92. In: Conferência APINCO 2004 de Ciência e Tecnologia Avícolas; São Paulo-Brasil. Campinas: FACTA; 2004.
- 10 Guy, J.S. & Bagust, T.J. 2003.** Laryngotracheitis. In: Barnes, H.J., Fadly, A.M., Glisson, J.R., McDougald, L.R., Swayne, D.E. (Ed). *Diseases of Poultry*, Iowa State University Press, Ames, pp. 121-134.
- 11 Hidalgo, H. 2003.** Infectious Laryngotracheitis: A Review. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 5: 157-168.
- 12 Hughes, C.S. & Jones, R.C. 1988.** Comparison of cultural methods for primary isolation of infectious laryngotracheitis virus from field materials. *Avian Pathology*, 17: 295-303.
- 13 Jonhson, M.A. & Tyack, S.G. 1995.** Molecular evolution of infectious laryngotracheitis virus (ILTV: Gallid herpesvirus 1): An ancient example of Alphaherpesviridae? *Veterinary Microbiology*, 46: 221-231.
- 14 Oldoni, I. & Garcia, M. 2007.** Caracterização dos vírus da laringotraqueíte infecciosa (ILTV) isolados nos Estados Unidos por PCR-RFLP de múltiplas regiões genômicas. In: XX Congresso Latinoamericano de Avicultura, Porto Alegre, Brasil, pp. 107-109.
- 15 Pang, Y., Wang, H., Girshick, T., Xie, Z. & Khan, M. 2002.** Development and application of a multiplex polymerase chain reaction for avian respiratory agents. *Avian Diseases*, 46: 691-699.

- 16 Reed, L.J. & Muench, H. 1938.** A simple method of estimating fifty percent endpoints. *American Journal of Hygiene*, 27: 493-497.
- 17 Schnitzlein, W.M., Radzevicius, J. & Tripathy, D.N. 1994.** Propagation of infectious laryngotracheitis virus in an avian liver cell line. *Avian Diseases*, 38: 211-217.
- 18 Sellers, H.S., Garcia, M., Glisson, J.R., Brown, T.P., Sander, J.S. & Guy, J.S. 2004.** Mild infectious laryngotracheitis in broilers in the southeast. *Avian Diseases*, 48: 430-436.
- 19 Silva, G.M.M. & Ristow, L.E. 2007.** Detecção de anticorpos contra laringotraqueite infecciosa das aves no Estado de Minas Gerais. In: XX Congresso Latinoamericano de Avicultura, Porto Alegre, Brasil, pp. 110-112.
- 20. Spilki, F.R., Almeida, R.S., Campalans, J. & Arns, C.W. 2006.** Susceptibility of different cell lines to infection with bovine respiratory syncytial virus. *Journal of Virological Methods*, 131: 130-133.
- 21 Vargas, R.E.S. 1995.** Laringotraqueite infecciosa das aves: Estudo epidemiológico em plantéis avícolas no Estado do Rio Grande do Sul. 2000. 106 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias)- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2000.
- 22 Veits, J., Köllner, B., Teifke, J.P., Granzow, H., Mettenleiter, T.C. & Fuchs, W. 2003.** Isolation and characterization of monoclonal antibodies against structural proteins of infectious laryngotracheitis virus. *Avian Diseases*, 47: 330-342.
- 23 Zöller, B., Redman-Muller, I., Nanda, I., Guttenbach, M., Dosch, E., Schmid, M., Zoorob, R. & Jungwirth, C. 2000.** Sequence comparison of avian interferon regulatory

factors and identification of the avian CEC-32 cell as a quail cell line. *Journal of Interferon Cytokine Research*, 20: 711-717.

Table 1. Titers of virus strains recovered after three passages of ILTV in different cell cultures. Titers were expressed in \log_{10} TCID₅₀/50 μ L. There was no detectable viral yield in HD11 and CEC-32 cell lines.

| Cell line | Field samples | Virus titer |
|------------------|----------------------|--------------------|
| CER | LVV13BR | 3.0 ^b |
| | LVV06BR | 3.0 ^b |
| Vero | LVV13BR | 4.0 ^b |
| | LVV06BR | 3.0 ^b |
| CEF | LVV13BR | 5.0 ^a |
| | LVV06BR | 4.0 ^b |
| HD11 | LVV13BR | -- |
| | LVV06BR | -- |
| CEC-32 | LVV13BR | -- |
| | LVV06BR | -- |

4. DISCUSSÃO

No Brasil, o ILTV foi descrito pela primeira vez em 1974 por Hipólito e colaboradores, e os últimos relatos oficiais da presença deste vírus estão restritos à região de Bastos-SP, em aves de postura comercial. Estudos epidemiológicos demonstram a ocorrência de anticorpos em plantéis avícolas nos Estados do Rio Grande do Sul, São Paulo, Minas Gerais e a existência de aves portadoras sem sinais clínicos aparentes incluindo aves criadas em fundo de quintal. Uma particularidade desta enfermidade é que o controle realizado através de um programa de vacinação com vírus vivo atenuado pode servir como fonte de infecção. Por se tratar de um herpes vírus, o estado de latência no nervo trigêmeo ocorre e pode ocasionar reversão de virulência através de passagens do vírus vivo atenuado em aves. Por esse motivo, a vacinação no Brasil é permitida somente com autorização do Ministério da Agricultura, em regiões endêmicas, como no surto que ocorreu em Bastos-SP.

O presente trabalho é composto por quatro artigos, sendo que o primeiro descreve o diagnóstico de infecções naturais por ILTV em perus. Para isto, um isolado de ILTV de perus foi inoculado em galinhas e perus susceptíveis que foram avaliados por isolamento viral, PCR, seqüenciamento, imunofluorescência e microscopia eletrônica. No segundo artigo, foi avaliada a diversidade genética entre os isolados brasileiros do ILTV provenientes de frangos e perus comerciais e de galinha de fundo de quintal. O terceiro artigo descreve a replicação do ILTV em diferentes cultivos celulares. No quarto artigo, está descrito o início de um trabalho que visa à deleção da glicoproteína E do ILTV de um isolado de campo, com o objetivo de se produzir, futuramente, uma vacina diferencial.

No primeiro artigo, descreveu-se a detecção de ILTV a partir de traquéia de perus provenientes de granjas comerciais com infecção respiratória. Um destes isolados foi escolhido para a realização de uma infecção experimental em galinhas e perus susceptíveis. O isolado de peru, inoculado experimentalmente, demonstrou ser de baixa patogenicidade uma vez que ambas as espécies adoeceram com sinais respiratórios leves entre os dias seis e 16 pós-inoculação (pi). Existe a suspeita de que cepas de ILTV pouco patogênicas, com sinais clínicos leves, podem causar a doença em condições de campo, por combinação de fatores como estresse e co-infecção de doenças respiratórias. Os achados histopatológicos revelaram corpúsculos de inclusão intranucleares em duas galinhas, nos dias oito e 10 pi,

que também apresentaram estágios de hemorragia, descamação do epitélio e necrose conforme a evolução da doença, sendo observada de forma mais severa nas galinhas. As lesões mais severas incluíram secreção de muco hemorrágico na traquéia em uma galinha aos 12 dias pi. Esses achados são similares aos encontrados na forma branda da doença (RUSSELL & TURNER, 1983; TIMURKAAN et al., 2003). Alguns autores reportam que corpúsculos de inclusão intranuclear estão presentes apenas no começo da infecção, aproximadamente, de um a cinco dias pi (PURCELL, 1971; GUY et al., 1991; VANDERKOP, 1993). Sellers et al. (2004) constataram que a ausência de sinais histopatológicos, como sincício e corpúsculo de inclusão intranuclear, podem ocorrer na forma branda da doença. A PCR direcionada ao gene da timidina kinase do genoma do ILTV também confirmou a presença de DNA viral e seu seqüenciamento foi comparado com a cepa 632 (KEELER et al., 1991) para verificar a especificidade dos produtos de amplificação. A seqüência de DNA do isolado de perus apresentou alta similaridade, sugerindo uma origem comum a dos isolados de galinha e vacinal. O isolado de peru também foi replicado em monocamada de fibroblasto de embrião de galinha de nove dias de incubação e foi confirmada a presença do ILTV por imunofluorescência indireta. Membranas de ovos embrionados de galinha inoculados com o isolado de peru, após quatro passagens, demonstraram lesão do tipo *pock*. Estes últimos foram recortados das membranas e fixados para a microscopia eletrônica, onde partículas características de herpes vírus foram encontradas. Como a morfologia de partículas dos herpes vírus são muito similares, PCRs para regiões distintas do HVT foram realizadas com resultados negativos, deixando clara a infecção por ILTV. A infecção de perus pelo ILTV apenas havia sido descrita a partir de infecção experimental (WINTERFIELD & SO, 1968). Portanto, esses resultados chamam a atenção para o primeiro caso de infecção natural de perus.

No segundo artigo, os isolados provenientes de traquéias de frangos e de perus, além de uma cepa vacinal, foram avaliados por sequenciamento nucleotídico, a partir de duas PCRs que visavam à amplificação de regiões distintas do genoma. Os produtos de amplificação da PCR direcionada ao gene da timidina kinase foram sequenciados e a comparação com as cepas disponíveis no GenBank foi realizada. Os isolados de peru foram reunidos em um grupo, juntamente com isolados provenientes de galinhas e a cepa vacinal.

A análise revelou alta similaridade sugerindo que os isolados que estão circulando no Brasil possuem uma origem comum recente. O grupo composto apenas por isolados de galinha apresentou três nucleotídeos diferentes do grupo formado pelos isolados de perus, galinhas e cepa vacinal, embora estas diferenças não tenham resultado em diferença de aminoácidos. Confirmou-se que a timidina kinase trata-se de um gene conservado como descrito previamente por (GRIFFIN & BOURSNEILL, 1990) e mais apropriado para diagnóstico do que estudos voltados para filogenia.

Sendo assim, a glicoproteína C (gC) do ILTV foi escolhida como alvo para a caracterização genética destes isolados, após a sua amplificação por PCR e seqüenciamento. A gC do ILTV ainda é pouco estudada, embora em outros alfa herpesvírus, como o BoHV, este gene tenha se mostrado adequado para a caracterização de diferentes isolados devido ao alto grau de variabilidade observado na região N-terminal (CLAUS et al., 2005). Os resultados demonstraram poucas diferenças de nucleotídeos que, entretanto, não acarretaram em mudança de aminoácidos. Desta forma, pode-se concluir, uma vez mais, que, ou os isolados são geneticamente muito homogêneos ou as regiões do genoma escolhidas para esta caracterização não são adequadas para esta finalidade. O seqüenciamento de regiões distintas do genoma do ILTV foi escolhido em substituição à técnica de PCR-RFLP, amplamente utilizada para a caracterização de isolados de campo e vacinais (OLDONI & GARCIA, 2007) por apresentar maior poder de discriminação. O controle por vacinação é permitido apenas em áreas endêmicas tornando-se difícil saber se os isolados de campo realmente tiveram uma origem vacinal ou de uma cepa de campo após passagens entre aves.

O terceiro artigo teve o objetivo de se determinar um cultivo celular capaz de replicar eficazmente o ILTV para ser utilizado no diagnóstico e na produção de grande concentração de DNA viral com vistas à produção de cepas recombinantes, o que é objeto do quarto artigo. Vários cultivos celulares de linhagens (*chicken embryo related cells* (CER), *African green monkey kidney cells* (Vero), *chicken macrophage cell line* (HD11), *avian fibroblast cell culture* (CEC-32) e um cultivo primário de fibroblasto de embrião de galinha (FEG) foram testados. Um isolado de ILTV de galinha e um de peru foram inoculados nestes cultivos para esta determinação. Os cultivos de CEC-32 e HD11 nunca haviam sido testados anteriormente e não foram capazes de replicar o ILTV. Calnek et al.

(1986), descreveu que a replicação do ILTV em macrófagos é viável, porém a replicação é restrita. A linhagem HD11 tem origem de fibroblasto de codorna e, por isso, o ILTV pode não ter sido replicado. Os cultivos de FEG e Vero foram capazes de replicar ambos os isolados virais em títulos mais baixos, como descrito previamente por Hughes & Jones, (1988). Embora o cultivo de fibroblasto seja considerado um substrato pobre para a replicação do ILTV (SCHNITZLEIN et al., 1994), dependa de ovos embrionados SPF e não se mantenha por muito tempo em cultura, os isolados virais replicaram atingindo títulos maiores do que os obtidos com as linhagens celulares neste experimento. Este experimento também descreveu a primeira utilização da linhagem CER para a replicação do ILTV. Esta linhagem foi capaz de replicar o ILTV em títulos mais baixos do que o FEG, embora tenha as vantagens de ser de fácil manuseio em laboratório e permitir a replicação de vários outros vírus, como descrito por (SPILKI et al., 2006). A inoculação em membrana cório-alantóide de ovos embrionados de nove dias de incubação, ainda foi o sistema que gerou os maiores títulos, produzindo lesões do tipo *pock*. Sellers et al. (2004) descreveram que algumas cepas de baixa patogenicidade, dos Estados Unidos, não foram capazes de replicar em cultivos primários de fígado e rim de embrião de galinha, assim como em células de linhagens, sendo sua propagação limitada *in vitro*, e elas causarem poucas alterações patológicas *in vivo*. O ciclo de replicação do ILTV tem sido pouco investigado e ainda há falta de linhagens celulares eficientes para a sua propagação e manipulação *in vitro* (FUCHS et al., 2007), já que o cultivo primário torna-se laborioso.

No Anexo 1, o projeto de deleção da glicoproteína E (gE) de um isolado de campo do vírus da laringotraqueíte (ILTV) foi incentivada por trabalhos prévios utilizando outros alfa herpesvírus, como o que realizou a deleção da gE do herpes vírus bovino tipo 1 (BoHV-1) (FRANCO, 2001) e recombinantes de herpes vírus equino tipo 4 (EHV-4) (DAMIANI et al., 2000). Para resolver o problema de reversão da virulência de algumas cepas vacinais, o desenvolvimento de vacinas contra o ILTV contendo o vírus vivo geneticamente modificado parece ser promissor (FUCHS et al., 2007).

Tomando por base a deleção por recombinação homóloga sítio dirigido, um cassete de clonagem foi construído utilizando-se um vetor plasmidial contendo duas regiões flaqueadoras da gE, a partir de uma cepa vacinal conhecida, e um gene marcador EGFP. A co-transfecção para uma recombinação sítio dirigida seria executada utilizando-se um

isolado de campo, porém esta etapa do trabalho não foi alcançada devido à dificuldade de purificação do DNA viral em quantidade suficiente. As dificuldades de se recuperar DNA viral purificado já haviam sido relatadas por outros autores (OLDONI & GARCIA, 2007; FUCHS et al., 2007), inclusive para a utilização de técnicas rotineiras como a de PCR-RFLP com objetivos epidemiológicos. Recombinantes do ILTV, geneticamente atenuados com deleção do gene da timidina kinase reduziram a virulência e induziram proteção em galinhas SPF desafiadas com isolado viral patogênico (SCHNITZLEIN et al., 1995; HAN et al., 2002). Assim como a deleção das glicoproteínas J e possivelmente a gG do ILTV (FUCHS et al., 2007). No entanto, o recombinante com deleção das glicoproteínas gI e gE do ILTV resultou em incapacidade de dispersão do vírus em células hospedeiras, indicando que as glicoproteínas deletadas podem ser essenciais para a replicação do ILTV (DEVLIN et al., 2006). Todavia, este tipo de construção pode ter afetado algum gene essencial para a replicação do vírus, como a US9, localizada posteriormente a gE com função pouco conhecida. Previamente, apenas os vírus da doença de Marek (MDV) e o da Varicela Zoster (VZV) gE/gI deletados mostraram ser essenciais para a replicação. As glicoproteínas gI e gE formam um heterodímero responsável pela dispersão viral célula a célula, comum entre os herpes vírus. No entanto, a deleção da gE pode gerar melhores resultados, como o BoHV-1 gE negativo descrito por (FRANCO, 2001), já que os alfa herpesvírus costumam ser conservados. Por outro lado, a deleção da gE do genoma do ILTV também será útil para um estudo de sua função e comportamento em cultivos celulares.

Para que o Brasil, segundo maior produtor e maior exportador mundial de carne de frangos e perus, consiga manter seu *status* de produção, devem ser reforçados os programas de prevenção contra as doenças avícolas listadas pelo Escritório Internacional de Epizootias (OIE). Para que isto se torne realidade para o ILTV, ainda se faz necessário um estudo epidemiológico básico para que se tomem decisões de controle desta doença, que ainda é considerada exótica no País.

5. CONCLUSÕES

1) Através de técnicas de caracterização viral utilizadas, verificou-se a presença do ILTV em plantéis de frangos e perus das regiões sudeste-sul do país. Esta é a primeira descrição de infecção natural do ILTV em perus.

2) Um isolado de peru, inoculado experimentalmente, demonstrou ser de baixa patogenicidade, sendo capaz de causar uma doença respiratória leve em galinhas e perus susceptíveis.

3) A análise da diversidade genética, a partir do sequenciamento das regiões da timidina quinase (TK) e glicoproteína C (gC) do genoma do ILTV, de isolados de campo de galinhas e perus, de uma cepa vacinal e das cepas disponíveis no GenBank demonstraram alta similaridade, com poucas alterações de nucleotídeos sem mudança de aminoácidos, sugerindo que os isolados são muito homogêneos ou que estas regiões do genoma não são adequadas para este tipo de estudo.

4) O cultivo primário de fibroblasto de embrião de galinha (FEG) e as linhagens CER e Vero foram capazes de replicar o ILTV. Esta foi a primeira descrição da utilização da linhagem CER como cultivo celular para o isolamento e replicação do ILTV.

5) As linhagens CEC-32 e HD11 não foram capazes de replicar o ILTV.

6) Um cassete de clonagem contendo as regiões flanqueadoras da glicoproteína E e o gene marcador EGFP foi construído para, posteriormente, ser utilizado na geração de vírus recombinante por recombinação homóloga para ser testado como vacina marcadora.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, F.; ANDREASEN, J.R.Jr. Comparison of diagnostic tests for infectious laryngotracheitis. **Avian Diseases**, v.40, p.290-295, 1996.

ABEF (Associação Brasileira dos Produtores e Exportadores de Frangos). **Relatório Anual**, 2007. Disponível em: <www.abef.com.br>. Acesso em: Dez. 2007.

ANDREASEN, J.R. Jr.; GLISSON, J.R.; VILLEGAS, P. Differentiation of vaccine strain and Georgia field isolates of infectious laryngotracheitis virus by their restriction endonuclease fragment patterns. **Avian Diseases**, v.34, p.646-656, 1990.

BAGUST, T.J.; CALNEK, B.W.; FAHEY, K.J. Gallid-1 herpesvirus infection in the chicken. 3. Reinvestigation of the pathogenesis of infectious laryngotracheitis in acute and early pos-acute respiratory disease. **Avian Diseases**, v.30, p.179-190, 1986.

BAGUST, T.J.; GUY, J.S. Laryngotracheitis. In: **Diseases of Poultry**. 10 ed., Ames: Iowa State University Press, 1997. p. 527-539.

BAGUST, T.J.; JONES, R.C.; GUY, J.S. Avian infectious laryngotracheitis. Review. **Revue Scientifique Et Technique De L Office International Des Epizooties**, v.19, p.483-492, 2000.

BARBOOM, S.A.; FORGACS, A.; SOLYOM, F. Development of an inactivated vaccine against laryngotracheitis (ILT)-serological and protection studies. **Avian Pathology**, v.15, p. 213-221, 1986.

BRANDLY, C.A.; BUSHNELL, L.D. A report of some investigations of infectious laryngotracheitis. **Poultry Science**, v.13, p. 212-217, 1934.

BELTRÃO, N.; LEÃO, J.A.; ROCHA, S.L.S.; FURIAN, T.Q.; BIANCO, A.J.; CANAL, C.W. Detection of infectious laryngotracheitis virus from poultry by nested-PCR. **Journal of the Brazilian Society for Virology**, v.34, n.1, p.72-73, 2003.

BELTRÃO, N.; FURIAN, T.Q.; LEÃO, J.A.; PEREIRA, R.A.; MORAES, L.B.; CANAL, C.W. Detecção do vírus da laringotraquite das galinhas no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.24, n.2, p.85-88, 2004a.

BEUG, H.; VON KIRCHBACH, A.; DÖDERLEIN, G.; FRANCOIS, J. Chicken hematopoietic cells transformed by seven strains of defective avian leukemia viruses display three distinct phenotypes of differentiation. **Cell**, v.18, p.375-390, 1979.

CALNEK, B.W.; FAHEY, K.J.; BAGUST, T.J. In vitro infection studies with infectious laryngotracheitis virus. **Avian Diseases**, v.30, p.327-336, 1986.

CARDOSO, T.C.; RAHAL, P.; PILZ, D.; TEIXEIRA, M.C.B.; ARNS, C.W. Replication of classical infectious bursal disease virus in the chicken embryo related cell line. **Avian Pathology**, v.29, p. 213-217, 2000.

CARDOSO, T.C.; SILVA, L.H.; ALBAS, A.; FERREIRA, H.L.; PERRI, S.H. Rabies neutralizing antibody detection by indirect immunoperoxidase serum neutralization assay performed on chicken embryo related cell line. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.99, p.531-534, 2004.

CHACÓN, J.L.; VILLARREAL, L.Y.; BRANDÃO, P.; FERREIRA, A.J.P. Desenvolvimento de uma técnica de PCR para a detecção de infecções clínicas e subclínicas da laringotraqueíte infecciosa. In: XX CONGRESSO LATINOAMERICANO DE AVICULTURA., 2007, Porto Alegre, **Resumos.**, 2007. p.181-183.

CHANG, P.W.; YATES, V.J.; DARDIRI, A.H.; FRY, D.E. Some observations on the propagation of infectious laryngotracheitis virus in tissue culture. **Avian Diseases**, v.4, p.384-390, 1960.

CHANG, P.C.; LEE, Y.L.; SHIEN, J.H.; SHIEH, H.K. Rapid differentiation of vaccine strains and field isolates of infectious laryngotracheitis virus by restriction fragment length polymorphism of PCR products. **Journal of Virological Methods**, v.66, p.179-186, 1997.

CLAUS, M.P.; ALFIERI, A.F.; FOLGUERAS-FLATSCHART, A.V.; WOISIACKI, S.R.; MEDICI, K.C.; ALFIERI, A.A. Rapid detection and differentiation of bovine herpesvirus 1 and 5 glycoprotein C gene in clinical specimens by multiplex-PCR. **Journal of Virological Methods**, v.128, p.183-188, 2005.

COVER, M.S. The early history of infectious laryngotracheitis. **Avian Diseases**, v.40, p.494-500, 1996.

CRAWSHAW, G.J.; BOYCOTT, B.R. Infectious laryngotracheitis in peafowl and pheasants. **Avian Diseases**, v.26, p.397-401, 1982.

CREELAN, J.L.; CALVERT, V.M.; GRAHAM, D.A.; McCULLOUGH, S.J. Rapid detection and characterization from field cases of infectious laryngotracheitis virus by real-time polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism. **Avian Pathology**, v.35, p. 173-179, 2006.

DAMIANI, A.M.; MATSUMURA, T.; YOKOYAMA, N.; MIKAMI, T.; TAKAHASHI, E. A deletion in the gI and gE genes of equine herpesvirus type 4 reduces viral virulence in the natural host and affects virus transmission during cell-to-cell spread. **Virus Research**, v.67, p.189-202, 2000.

DAVISON, S. Vaccinal Laryngotracheitis-Overview in the United States. In: 19th ANNUAL MEETING OF THE US ANIMAL HEALTHY ASSOCIATION, 2005, Hershey, Pennsylvania, **Proceedings**. 2005. p. 580.

DAVISON, A.J.; EBERLE, R.; HAYARD, G.S.; McGEOCH, D.J.; MINSON, A.C.; PELLET, P.E.; ROIZMAN, B.; STUDDERT, M.J.; THIRY, E. Family *Herspesviridae*, in: FAUQUET, C.M.; MAYO, M.A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L.A. (Eds.). **Virus Taxonomy**, Academic press, San Diego, 2005. p.193-212.

DEVLIN, J.M.; BROWNING, G.F.; GILKERSON, J.R. A glycoprotein I and and glycoprotein E deficient mutant of infectious laryngotracheitis virus exhibits impaired cell-to-cell spread in cultured cells. **Archives of Virology**, v.151, p.1281-1291, 2006.

DINGWELL, K.S.; DOERING, L.C.; JOHNSON, D.C. Glycoproteins E and I facilitate neuron-to-neuron spread of Herpes Simplex Virus. **Journal of Virology**, v.69, p.7087-7098, 1995.

EISENBERG, R.J.; PONCE DE LEON, M.; FRIEDMAN, H.M.; FRIES, L.F.; FRANK, M.M.; HASTINGS, J.C.; COHEN, G.H. Complement component C3b binds directly to purified glycoprotein C of herpes simplex virus types 1 and 2. **Microbial Pathogenesis**, v.3, p.423-435, 1987.

EL KARAMANY, R.M.; IMAM, I.Z.; FRAID, A.H.; SABER, M.S. Susceptibility of CER cell line to Rift Valley fever virus. **Journal of Egyptian Public Health Association**, v.54, p.105-114, 1979.

FRANCO, A.C. **Recombinantes de herpes vírus bovino tipo 1 com deleções nos genes gE e US9**. 2001. 193 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.

FRIEDMAN, H. M.; COHEN, G. H.; EISENBERG, R. J.; SEIDEL, C. A.; CINES, D. B. Glycoprotein-C of Herpes-Simplex Virus-1 Acts as a Receptor for the C3b Complement Component on Infected-Cells. **Nature**, v.309, p.633-635, 1984.

FUCHS, W.; ZIEMANN, K.; TEIFKE, J.P.; METTENLEITER, T.C. The non-essential UL50 gene of avian laryngotracheitis virus encodes a functional dUTPase witch is not a virulence factor. **Journal of General Virology**, v.81, p.627-638, 2000.

FUCHS, W.; VEITS, J.; HELFERICH, D.; GRANZOW, H.; TEIFKE, J.P.; METTENLEITER, T.C. Molecular biology of avian infectious laryngotracheitis virus. **Veterinary Research**, v.38, p.261-279, 2007.

GAMA, N.M.S.Q. Laringotraqueite: O caso brasileiro. In: CONFERÊNCIA APINCO 2004 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS., 2004, Santos; **Anais**, 2004. v.2, p.85-92.

GARCIA, M.; RIBLET, S. Characterization o infectious laryngotracheitis virus isolates: Demonstration of viral subpopulations within vaccine preparations. **Avian Diseases**, v.45, p.558-566, 2001.

GRIFFIN, A.M.; BOURSNELL, M.E.G. Analysis of the nucleotide sequence of DNA from the region of the thymidine kinase gene of infectious laryngotracheitis virus: Potential evolutionary relationships between the herpesvirus subfamilies. **Journal of General Virology**, v.71, p.841-850, 1990.

GUO, P.; SCHOLTZ, E.; TUREK, J.; NORDGREEN, R.; MALONEY, B. Assembly pathway of avian infectious laryngotracheitis virus. **American Journal of Veterinary Research**, v. 54, p. 2031-2039, 1993.

GUY, J.S.; BARNES, H.J.; MORGAN, L.M. Virulence of infectious laryngotracheitis viruses: comparison of modified-live vaccine viruses and North Carolina field isolates. **Avian Diseases**, v.34, p.106-113, 1990.

GUY, J.S.; BARNES, H.J.; SMITH, L.G. Increased virulence of modified-live infectious laryngotracheitis vaccine virus following bird-to bird passage. **Avian Diseases**, v.35, p.348-355, 1991.

GUY, J.S.; BARNES, H.J.; SMITH, L.G. Rapid diagnosis of infectious laryngotracheitis using a monoclonal antibody-based immunoperoxidase procedure. **Avian Pathology**, v.21, p.77-86, 1992.

GUY, J.S.; BAGUST, T.J. Laryngotracheitis. In: SAIF, Y.M.; BARNES, H.J.; FADLY, A.M.; CLISSON, J.R.; McDOUGALD, L.R.; SWAYNE, D.E.(Eds.). **Diseases of Poultry**. 11 ed., Ames: Iowa State University Press, 2003. p.121-134.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v.41, p. 95-98, 1999.

HAN, M.G.; KIM, S.J. Analysis of Korean strains of infectious laryngotracheitis virus by nucleotide sequences and restriction fragment length polymorphism. **Veterinary Microbiology**, v.83, p.321-331, 2001.

HAN, M.G.; KWEON, C.H.; KIM, S.J. Pathogenicity and vaccine efficacy of a thimidine kinase gene deleted infectious laryngotracheitis virus expressing the green fluorescent protein gene. **Archives of Virology**, v.147, p.1017-1031, 2002.

- HANSON, L.E. Laryngotracheitis. In: **Diseases of Poultry**. Ames: Iowa State University Press, 1991. p.485-495.
- HIDALGO, H. Infectious Laryngotracheitis: A Review. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v.5, p.157-168, 2003.
- HIPOLITO O.; SOARES, L.A.; PEREIRA O.A.C.; PINTO, A.A.; BOTINO, J.A. Isolamento e identificação do vírus da laringotraqueite infecciosa das galinhas no Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA.,1974, Rio de Janeiro, **Anais**, 1974. p.16.
- HITCHNER, S.B.; FABICANT, J.; BAGUST, T.J. A fluorescent-antibody study of the pathogenesis of infectious laryngotracheitis. **Avian Diseases**, v.21, p.185-194, 1977.
- HUGHES, C.S.; JONES, R.C. Comparison of cultural methods for primary isolation of infectious laryngotracheitis virus from field materials. **Avian Pathology**, v.17, p.295-303, 1988.
- HUGHES, C.S.; JONES, R.C.; GASKEL, R.M.; BRADBURY, J.M.; JORDAN, F.T.W. Effects of certain stress factors on the re-excretion of infectious laryngotracheitis virus from latently infected carrier birds. **Research Veterinary Science**, v.46, p.247-276, 1989.
- HUGHES, C.S.; WILLIAMS, R.A.; GASKELL, R.M.; JORDAN, F.T.W.; BRADBURY, J.M.; BENNETT, M.; JONES, R.C. Latency and reactivation of infectious laryngotracheitis vaccines virus. **Archives of Virology**, v.121, p.213-218, 1991.
- INOUE, A.Y. Controle de enfermidades respiratórias em poedeiras comerciais. In: CONFERÊNCIA APINCO 2004 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS., 2005, Santos; **Anais**, 2005., p.191-208.
- JONHSON, M.A.; TYACK, S.G. Molecular evolution of infectious laryngotracheitis virus (ILTV: Gallid herpesvirus 1): An ancient example of Alphaherpesviridae? **Veterinary Microbiology**, v.46: p.221-231, 1995.
- JORDAN, F.T.W. Infectious Laryngotracheitis. In: McFERRAN, J.B.; McNULTY, M.S. **Virus Infections of Birds**. Elsevier,1993. v.4. p.19-35.
- JORDAN, F.T.W.; CHUBB, R.C. The agar gel diffusion technique in the diagnosis of infectious laryngotracheitis (I.L.T.) and its differentiation from fowl pox. **Research Veterinary Science**, v.3, p.245-255, 1962.
- KALETA, E.F.; REDMAN, T.H.; HEFFELS-REDMAN, U.; FRESE, K. Zum Nachweis der Latenz des attenuierten virus der infektion laryngotracheitis des Huhnes im trigeminalganglion. **Deutsch Tierarzt Wochensh**, v.93, p.40-42, 1986.

KEELER, C.L.; KINGSLEY, D.H.; BURTON, C.R.A. Identification of the thymidine kinase gene of infectious laryngotracheitis virus. **Avian Diseases**, v. 35, p.920-929, 1991.

KIRKPATRICK, N.C.; MAHMOUDIAN, A.; O'ROUKE, D.; NOORMOHAMMADIA, A.H. Differentiation of infectious laryngotracheitis virus isolates by restriction fragment length polymorphic analyses of polymerase chain reaction products amplified from multiple genes. **Avian Diseases**, v.50, p.28-34, 2006.

KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. **Brief Bioinform**, v.5, p.150-163, 2004.

LI, H.; LIU, S.; KONG, X. Characterization of genes encoding UL24, TK, and gH proteins from duck enteritis virus (DEV): a proof for the classification of DEV. **Virus genes**, v.33, p.221-227, 2006.

MEULEMANS, G.; HALEN, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detecting infectious laryngotracheitis viral antibodies in chicken serum. **Avian Pathology**, v.11, p.361-368, 1982.

OLDONI, I.; GARCIA, M., 2007. Caracterização dos vírus da laringotraqueíte infecciosa (ILTV) isolados nos Estados Unidos por PCR-RFLP de múltiplas regiões genômicas. In: XX CONGRESSO LATINOAMERICANO DE AVICULTURA., 2007, Porto Alegre, **Resumos.**, 2007. p.107-109.

OSTERRIEDER, N. Construction and characterization of an equine herpesvirus 1 glycoprotein C negative mutant. **Virus Research**, v.59, p.165-177, 1999.

PANG, Y.; WANG, H.; GIRSHICK, T.; XIE, Z.; KHAN, M. Development and application of a multiplex polymerase chain reaction for avian respiratory agents. **Avian Diseases**, v.46, p.691-699, 2002.

PURCELL, D.A. The ultrastructural changes produced by infectious laryngotracheitis virus in tracheal epithelium of the fowl. **Research Veterinary Science**, v.12, p.455-458, 1971.

REED, L.J.; MUENCH, H.. A simple method of estimating fifty percent endpoints. **American Journal of Hygiene**, v.27, p.493-497, 1938.

REDORBOSA, X.; PIÑOL, J.; PEREZ-PONS, J.A.; LLOBERAS, J.; NAVAL, J.; SERRA-HARTMANN, X.; ESPUÑA, E.; QUEROL, E. Glycoprotein E of bovine herpesvirus type 1 is involved in virus transmission by direct cell-to-cell spread. **Virus Research**, v.45, p.59-68, 1996.

ROBERTSON, G.M.; EGERTON, J.R. Replication of infectious laryngotracheitis virus in chickens following vaccination. **Australian Veterinarian Journal**, v.57, p.119-123, 1981.

RODRIGUEZ-AVILA, A.; OLDONI, I.; RIBLET, S.M.; GARCIA, M., 2007. Estudio del tropismo y la transmisión de las vacunas vivas atenuadas del virus de laringotraqueitis infecciosa (LTI). In: XX CONGRESSO LATINOAMERICANO DE AVICULTURA., 2007, Porto Alegre, **Resumos.**, 2007. p.104-106.

ROIZMAN, B.; CARMICHAEL, L.E.; DEINHARDT, F.; DETHE, G.; NAHMIAS, A.J.; PLOWRIGHT, W.; RAPP, F.; SHELDRIK, P.; TAKAHASHI, M.; WOLF, K. Herpesviridae - Definition, provisional nomenclature and taxonomy. **Intervirolgy**, v.16, p.201-217, 1981.

ROIZMAN, B. The family Herpesviridae: General description, taxonomy and classification. In: ROIZMAN, B (Ed.). **The Herpesviruses**. New York: Plenum Press, 1982. v. 1, p.1-23.

ROIZMAN, B.; KNIPE, D.M. Herpes simplex viruses and their replication, In: KNIPE, D.M., HOWLEY, P.M. (Eds.). **Field Virology**. Philadelphia, 2001. p.2399-2459.

RUSSEL, R.G.; TURNER, A.J. Characterization of infectious laryngotracheitis viruses: antigenic comparison of neutralization and immunization studies. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v.47, p.163-171, 1983.

SAIF, Y.M.; ROSENBERGER, J.K.; CLOUD, S.S.; WILD, M.A.; McMILLEN, J.K.; SCHWARTZ, R.D. Efficacy and safety of a recombinant herpesvirus of turkeys containing genes from infectious laryngotracheitis virus. In: PROCEEDINGS AMERICAN VETERINARY MEDICINE ASSOCIATION., 1994, Minneapolis, **Proceedings.**, 1994, p.154.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular cloning: a Laboratory Manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SAMBERG, Y.; CUPERSTEIN, E.; BENDHEIN, U.; ARONOVICI, I. The Development of a Vaccine against Avian Infectious Laryngotracheitis IV. Immunization of Chickens with a Modified Laryngotracheitis Vaccine in the Drinking. **Avian Diseases**, v.15, p. 413-417, 1969.

SCHMIDT, U. **Laringotraqueíte infecciosa Aviária. In: Doenças infecciosas dos animais domésticos**. 1. ed., São Paulo: Roca, 1988.

SCHNITZLEIN, W.M.; RADZEVICIUS, J.; TRIPATHY, D.N. Propagation of infectious laryngotracheitis virus in an avian liver cell line. **Avian Diseases**, v.38, p.211-217, 1994.

SCHNITZLEIN, W.M.; WINANS, R.; ELLSWORTH, S.; TRIPATHY, D.N. Generation of thymidine kinase-deficient mutants of infectious laryngotracheitis virus. **Virology**, v.209, p.304-314, 1995.

- SCHOLTZ, E.; PORTER, R.E.; GUO, P. Differential diagnosis of infectious laryngotracheitis from other avian respiratory diseases by a simplified PCR procedure. **Journal of Virological Methods**, v.5, p.313-322, 1994.
- SELLERS, H.S.; GARCIA, M.; GLISSON, J.R.; BROWN, T.P.; SANDER, J.S.; GUY, J.S. Mild infectious laryngotracheitis in broilers in the southeast. **Avian Diseases**, v.48, p.430-436, 2004.
- SILVA, G.M.M.; RISTOW, L.E., 2007. Detecção de anticorpos contra laringotraqueíte infecciosa das aves no Estado de Minas Gerais. In: XX CONGRESSO LATINOAMERICANO DE AVICULTURA., 2007, Porto Alegre, **Resumos.**, 2007. p. 110-112.
- SPIPKI, F.R.; ALMEIDA, R.S.; CAMPALANS, J.; ARNS, C.W. Susceptibility of different cell lines to infection with bovine respiratory syncytial virus. **Journal of Virological Methods**, v.131, p.130-133, 2006.
- TIMURKAAN, N.; YILMAZ, F.; BULUT, H.; ÖZER, H.; BOLAT, Y. Pathological and immunohistochemical findings in broilers inoculated with low virulent strain of infectious laryngotracheitis virus. **Journal of Veterinary Science**, v.4, p.175-180, 2003.
- TONG, G.Z.; ZHANG, S.J.; MENG, S.S.; WANG, L.; QIU, H.J.; WANG, Y.F.; YU, L.; WANG, M. Protection of chickens from infectious laryngotracheitis with a recombinant fowlpox virus expressing glycoprotein B of infectious laryngotracheitis virus. **Avian Pathology**, v.30, p. 143-148, 2001.
- TURNER, A.J. Persistence of virus in respiratory infections of chickens. **Australian Veterinary Journal**, v.48, p.361-363, 1972.
- VANDERKOP, M.A. Infectious laryngotracheitis in commercial broiler chickens. **Canadian Veterinary Journal**, v.34, p.183-185, 1993.
- VAN OIRSCHOT, J.T.; KAASHOEK, M.J.; MARIS-VELDHUIS, M.A.; RIJSEWIJK, F.A. Strains of bovine herpesvirus 1 that do not express an epitope on glycoprotein E in cell culture still induce antibodies that can be detected in a gE-blocking ELISA. **Veterinary Microbiology**, v.65, p.103-113, 1999.
- VARGAS, R.E.S. **Laringotraqueíte infecciosa das aves: Estudo epidemiológico em plantéis avícolas no Estado do Rio Grande do Sul**. 2000. 106 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias)- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2000.
- VEITS, J.; KÖLLNER, B.; TEIFKE, J.P.; GRANZOW, H.; METTENLEITER, T.C.; FUCHS, W. Isolation and characterization of monoclonal antibodies against structural proteins of infectious laryngotracheitis virus. **Avian Diseases**, v.47, p.330-342, 2003.

VILLARREAL, L.Y.B.; BRANDÃO, P.E.B.; CHACON, J.L.V.; DORETTO, L.; ITO, N.; GAMA, N.S.; ISHIZUKA, M.M.; LUCHESE, A.; BUCHALA, F.; ASTOLFI-FERREIRA, C.S.; FERREIRA, A.J.P. Detection and molecular characterization of infectious laryngotracheitis virus in laying hens in Brazil. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v.6, p.253-256, 2004.

WILD, P.; COOK, S.; COCHRAN, M. A genomic map of infectious laryngotracheitis virus and the sequence and organization of genes present in the unique short and flanking regions. **Virus genes**, v.12, p.107-116, 1996.

WILD, P.; SCHRANER, E.M.; PETER, J.; LOEPFE, E.; ENGELS, M. Novel entry pathway of bovine herpesvirus 1 and 5. **Journal of Virology**, v.72, n.12, p.9561-9566, 1998.

WILLIAMS, R.A.; BENNETT, M.; BRADBURY, J.M.; GASKELL, R.M.; JONES, R.C.; JORDAN, F.T.W. Demonstration of sites of latency of infectious laryngotracheitis virus using the polymerase chain reaction. **Journal of General Virology**, v.73, p.2415-2420, 1992.

WINTERFIELD, R.W.; SO, I.G. Susceptibility of turkeys to infectious laryngotracheitis. **Avian Diseases**, v.12, p.191-202, 1968.

YORK, J.J.; FAHEY, K.J. Diagnosis of infectious laryngotracheitis using a monoclonal antibody ELISA. **Avian Pathology**, v.17, p.173-182, 1988.

YORK, J.J.; FAHEY, K.J. Vaccination with affinity-purified glycoproteins protects chickens against infectious laryngotracheitis herpesvirus. **Avian Pathology**, v.20, p.693-704, 1991.

ZIEMANN, K.; METTENLEITER, T.C.; FUCHS, W. Gene arrangement within the unique long genome region of infectious laryngotracheitis virus is distinct from that of other alphaherpesvirus. **Journal of Virology**, v.72, p. 847-852, 1998.

ZÖLLER, B.; REDMAN-MULLER, I.; NANDA, I.; GUTTENBACH, M.; DOSCH, E.; SCHMID, M.; ZOOROB, R.; JUNGWIRTH, C. Sequence comparison of avian interferon regulatory factors and identification of the avian CEC-32 cell as a quail cell line. **Journal of Interferon Cytokine Research**, v.20, p.711-717, 2000.

ANEXO 1**Deleção da glicoproteína E (gE) do vírus da laringotraqueíte infecciosa aviária (ILTV)***

* Dados preliminares. Manuscrito em fase de conclusão e redação, a ser submetido a periódico científico.

**DELEÇÃO DA GLICOPROTEÍNA E (gE) DO VÍRUS DA LARINGOTRAQUEÍTE
INFECCIOSA AVIÁRIA (ILTV)**

Cristiana Portz, Ana Cláudia Franco, Herbert Reck, Nilzane Beltrão, Cláudio Wageck

Canal

Resumo

A glicoproteína E dos alfa herpesvírus vem sendo associada à virulência e latência. O presente trabalho teve como objetivo a deleção da glicoproteína E (gE) do vírus da laringotraqueíte (ILTV) para o desenvolvimento de recombinantes. Um cassete de clonagem foi construído utilizando-se o plasmídeo pCR2.1 contendo duas regiões flanqueadoras da gE, a partir de uma cepa vacinal, e um gene marcador EGFP. As etapas de montagem do cassete foram todas concluídas, entretanto a etapa final de co-transfecção para uma recombinação sítio dirigida não foi alcançada devido à dificuldade de purificação do DNA viral. O presente trabalho ainda encontra-se em andamento.

1. Introdução

A Laringotraqueite Infecciosa Aviária (LTI) é de uma doença respiratória causada por um herpes vírus que acomete principalmente as galinhas de postura comercial, de distribuição geográfica cosmopolita. O ILTV trata-se de um Gallid herpesvírus 1 classificado na família *Herpesviridae* da subfamília *Alfaherpesvirinae* composto por DNA de fita dupla e genoma de aproximadamente 155 kb (ROIZMAN, 1982). Para a prevenção do ILTV, vacinas com vírus vivo têm sido utilizadas por muitas décadas. A maioria destas vacinas tem uma boa eficácia, entretanto, muitas delas ainda possuem uma virulência residual que pode aumentar significativamente após passagens em aves susceptíveis e resultar em surtos de LTI (ANDREASEN et al., 1990; GUY et al., 1991). Para resolver o problema de reversão da virulência de algumas cepas vacinais, foram produzidas e testadas, eficazmente, as vacinas com vírus inativado e vacinas de subunidades contendo glicoproteínas imunogênicas purificadas (BARBOOM et al., 1986; YORK & FAHEY, 1991). Entretanto, o alto custo de produção não compensaria a imunização em larga escala. Mais recentemente, estuda-se a geração de mutantes de ILTV atenuados por deleção de genes que determinam virulência. A infectividade do DNA genômico do ILTV permite a geração de vírus mutantes através de uma recombinação homóloga com co-transfecção plasmidial, que carrega a deleção ou inserção desejada (FUCHS et al., 2007). Atualmente, quatorze genes do genoma do ILTV já foram deletados com sucesso (UL0, ORF A, ORF B, ORF C, ORF D, ORF E, UL10, UL21, UL23, UL47, UL49.5, UL50, US4, US5), sendo todos indispensáveis para a replicação viral *in vitro*, desde que se tenha um cultivo celular capaz de propagar o ILTV recombinante e produzir placas virais (FUCHS et al., 2007).

Um recombinante do ILTV com deleção do gene da timidina kinase diminuiu a virulência e induziu proteção em galinhas SPF desafiadas com vírus virulento (HAN et al., 2002). Recentemente, o desenvolvimento de um ILTV mutante gE e gI negativo mostrou uma redução na capacidade de dispersão viral célula-célula com conseqüente falha na produção de placas virais (DEVLIN et al., 2006).

A glicoproteína E (gE) dos alfa herpes vírus parece estar associada à virulência e latência viral. A gE e gI do herpes vírus simplex (HSV) estão associados a eficiente transmissão neurônio-neurônio do vírus nas sinapses nervosas (DINGWELL et al., 1995). As vacinas diferenciais possuem a vantagem de permitir a distinção da resposta imune induzida por animais vacinados e por animais infectados com vírus selvagem ou de campo (VAN OIRSCHOT et al., 1999). Além de possibilitar a diferenciação de respostas imunes de animais enfermos e vacinados, o uso de vacinas diferenciais tem ainda a vantagem de reduzir a circulação do vírus de campo facilitando o controle das infecções virais. O ILTV no Brasil é considerado exótico e ainda vem sendo estudado por poucos grupos de pesquisa vinculados a universidades. O presente trabalho almejou a deleção da glicoproteína E de um isolado de campo e vacinal do ILTV.

2. Material e Métodos

2.1. Padronização do cultivo celular

Inicialmente, foi necessário estabelecer um cultivo de células que permitiria a obtenção do ILTV em altos títulos. Foram testados o cultivo primário de fibroblasto de embrião de galinha e linhagens celulares como as células VERO e CER (chicken embryo related). Os cultivos celulares foram mantidos em meio mínimo essencial de Eagle (E MEM, Gibco®) suplementado com 5% de soro fetal bovino, e uma suspensão de antibióticos.

2.2. Isolados virais utilizadas

Os isolados virais utilizados na realização deste projeto compreendem um isolado de campo isolado de galinha (LVV13BR) obtido e caracterizado em trabalho prévio, e a cepa vacinal (Solvay Animal Health, Inc., IA, USA).

2.3. Obtenção do DNA viral

Após a padronização do cultivo celular, foi realizada a extração do DNA viral a partir de 200 µL de suspensão viral. O DNA viral foi processado pela digestão com proteinase K, seguida de extração com fenol-clorofórmio (SAMBROOK & RUSSEL, 2001). Após a precipitação com acetato de sódio e isopropanol, o DNA viral foi ressuspenso em 50 µL de TE (10 mM Tris-HCL pH 8,0, 1 mM EDTA).

2.4. Oligonucleotídeos

As reações de PCR foram realizadas para a obtenção dos fragmentos flanqueadores da região gênica a ser deletada. O primeiro par de oligonucleotídeos corresponde a uma região anterior a glicoproteína E (região 5' de gE), e o segundo par, a uma região posterior a glicoproteína E (região 3' da gE).

2.5. Ligação e clonagem

Os produtos da PCR foram imediatamente ligados em um vetor plasmidial TA Cloning kit Top10 pCR 2.1. (Invitrogen).

2.6. Transformação plasmidial

As transformações em células competentes (TOP 10) foram realizadas de acordo com a orientação do fabricante.

2.7. Construção e seleção do recombinante

As co-transfecções para a obtenção dos recombinantes serão realizadas em um próximo trabalho, de acordo com o protocolo de FRANCO, 2001.

3. Resultados

3.1. Padronização do cultivo celular

O ILTV foi replicado primeiramente em membrana cório-alantóide de ovos embrionados de nove dias de incubação para atingir maiores títulos. O cultivo celular escolhido para a replicação e co-transfecção do ILTV foi o de fibroblasto de embrião de galinha. Os cultivos celulares foram mantidos em meio mínimo essencial de Eagle (E MEM, Gibco®) suplementado com 5% de soro fetal bovino e uma suspensão de antibióticos (200 UI/mL de penicilina, 200 mg/mL de estreptomicina).

3.2. Obtenção do DNA viral

O DNA viral foi extraído a partir de membrana córioalantóide (MCA) inoculadas, respectivamente, com ambos isolados virais. A partir de seis MCA, as lesões do tipo *pock* foram recortadas e lisadas por uma suspensão de digestão contendo proteinase K (200 µg/mL), 10% de SDS e TE (10 mM de Tris-Cl, 5 mM de EDTA, pH 8.0), sendo incubado a 37⁰C, sob agitação leve, por uma hora. Em seguida adicionou-se 0,3 M de NaCl e a suspensão foi tratada com igual volume de fenol saturado (Invitrogen, USA). A centrifugação foi de 3000 RPM por 30 minutos e o sobrenadante foi colhido e precipitado com isopropanol e estocado a -20⁰C, por duas horas. Após a precipitação, o DNA enovelado foi colhido com o auxílio de uma ponteira e ressuspenso em 10 mL de TE. Posteriormente, o DNA viral ressuspenso foi deixado sob agitação leve, à temperatura ambiente, por 18 horas.

3.3. Oligonucleotídeos utilizados para a Reação Polimerásica em Cadeia (PCR)

As reações de PCR foram realizadas para a obtenção dos fragmentos flanqueadores da região gênica a ser deletada. O primeiro par de oligonucleotídeos obtido com a ajuda do programa Vector NTI™ Suite 8.0 corresponde a uma região anterior a glicoproteína E (gE), que foi denominada de região 5' da gE, e o segundo par de oligonucleotídeos, que corresponde a uma região posterior a gE, foi denominada de região 3' da gE (Tabela 1).

As reações de PCR foram realizadas de acordo com o protocolo descrito por (SAMBROOK & RUSSEL, 2001). A PCR para a região 5' gE foi realizada para o volume final de 25 µl, contendo 1 µl (200 µg/µL) de DNA molde, 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 3 mM MgCl₂, 2 mM de cada dideoxynucleotídeo (dNTP), 20 pmol de cada oligonucleotídeo e 0,5 unidades de *Taq* DNA polimerase (5 U/µL) (CenBiot Enzimas, Porto Alegre, Brasil). O programa de ciclos da PCR correspondente a região 5' gE incluiu 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 52°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 2 minutos e uma extensão final de 72°C por 10 minutos. O programa de ciclos para a região 3' gE seguiu da mesma forma descrita, com exceção da temperatura de anelamento que foi de 56°C por 1 minuto e a concentração de MgCl₂ para a PCR foi de 2.0 mM. As amplificações de DNA viral foram executadas no termociclador Perkin Elmer GeneAmp PCR System 2400 (Applied Biosystems). A eletroforese do produto amplificado foi realizada em gel de agarose 1,2% corado com 0,5 µg/mL de brometo de etídio.

A purificação de DNA a partir de géis de agarose foi realizada através do kit de purificação *GFX DNA and Gel Band Purification Kit* (Amersham Biosciences, Sweden) seguindo as orientações do fabricante.

3.4. Clonagem das regiões flanqueadoras da gE

A ligação e clonagem dos produtos da PCR de cada fragmento flanqueador da gE (3'e 5') foram imediatamente ligados no vetor plasmidial pCR 2.1 (TA Cloning kit Top10, Invitrogen) e transformados em *Escherichia coli* (células competentes Top10 do kit). As ligações e transformações foram realizadas segundo recomendação do fabricante comercial.

A extração do DNA plasmidial para a checagem de ambos os fragmentos flanqueadoras da gE foi realizada pelo método de lise alcalina de células bacterianas *Miniprep* (SAMBROOK & RUSSEL, 2001). Após a obtenção dos plasmídeos, estes foram avaliados em relação à concentração e integridade através da eletroforese em gel de agarose.

3.5. Construção do cassete de clonagem

Ambos os fragmentos 5'e 3' gE foram clonados no sítio para a enzima de restrição *EcoRI* (Figura 1) dos respectivos vetores plasmidiais e seqüenciados com o oligonucleotídeo M13 do plasmídeo para a checagem dos fragmentos. O fragmento 5'gE permaneceu neste sítio e sua orientação foi também avaliada através da enzima de restrição *AvaI* (New England Biolabs, MA, USA). O fragmento 3'gE foi retirado do plasmídeo pCR 2.1 através da clivagem por *EcoRI* (New England Biolabs, MA, USA), o DNA correspondente ao fragmento, em seguida, foi recortado do gel de agarose, purificado e tratado com a enzima *Large Fragment of DNA Polymerase I* (Invitrogen, USA) com o objetivo de fazer pontas cegas. Posteriormente, o plasmídeo contendo o fragmento 5'gE foi aberto no sítio de *Not I* e também foi submetido ao tratamento da enzima *Large Fragment of DNA Polymerase I* (Invitrogen, USA) e fosforilado com o auxílio da enzima *Alkaline*

Phosphatase Calf Intestinal (CIAP, Invitrogen, USA), segundo recomendações do fabricante. Posteriormente, o fragmento 3'gE, já preparado, foi ligado no plasmídeo contendo o fragmento 5'gE, com o auxílio da enzima *T4 Ligase* (Invitrogen, USA), na proporção 3:1. Novamente foi transformado em *E. coli*, o DNA plasmidial extraído por *Miniprep* e a checagem da orientação do fragmento 3'gE foi realizado através da clivagem com as enzimas de restrição *Sal I* e *Bgl II* (New England Biolabs, MA, USA) (Figura 2).

Após a checagem das orientações dos fragmentos 5'e 3'gE clonados, um gene marcador EGFP (enhanced green fish protein) para a seleção do recombinante foi clonado no sítio *Eco RV* do mesmo plasmídeo. Utilizou-se o pEGFP-N1 (CLONETECH Laboratories, Inc.), com o número de acesso U55762 no GenBank. O cassette contendo o EGFP, SV40 poly A e o promotor CMV foi retirado do plasmídeo original com o auxílio das enzimas de restrição *Ase I* e *Afl II* (New England Biolabs, MA, USA) (Figura 3). Posteriormente, o DNA correspondente a este fragmento foi recortado do gel de agarose, purificado e tratado com a enzima *Large Fragment of DNA Polymerase I* (Invitrogen, USA). A ligação foi realizada com o auxílio da enzima *T4 Ligase* (Invitrogen, USA), na proporção 3:1. A checagem da orientação do fragmento EGFP foi realizado através da clivagem com a enzima de restrição *Hind III* (New England Biolabs, MA, USA).

3.6. Detecção dos recombinantes

A expressão do gene GFP nas células infectadas com ILTV recombinantes será confirmada pela visualização da autofluorescência. Posteriormente, as placas virais fluorescentes serão isoladas com o auxílio de uma ponteira e passadas pelo menos três vezes consecutivas em cultivo celular, segundo protocolo descrito por (FRANCO, 2001).

Para a caracterização do vírus deletado será utilizada a técnica de PCR com oligonucleotídeos que amplificam a gE do ILTV, previamente descrita por GARCIA & RIBLET (2001).

4. Discussão

O cassete de clonagem contendo as regiões flanqueadoras da gE e o EGFP foi concluído, entretanto a purificação do DNA viral, em quantidade de 1 µg para a realização da etapa de co-transfecção não foi alcançada, após a utilização de protocolos distintos de extração de DNA viral (KEELER et al., 1991, WILD et al., 1996; FRANCO, 2001).

Recombinantes do ILTV, geneticamente atenuados com deleção do gene da timidina kinase reduziram a virulência e induziram proteção em galinhas SPF desafiadas com isolado viral patogênico (SCHNITZLEIN et al., 1995; HAN et al., 2002). Assim como a deleção das glicoproteínas J e possivelmente a gG do ILTV (FUCHS et al., 2007). Em contraste, o recombinante com deleção das glicoproteínas gI e gE do ILTV resultou em incapacidade de dispersão do vírus em células hospedeiras, indicando que as glicoproteínas deletadas podem ser essenciais para a replicação do ILTV. Previamente, apenas os vírus da doença de Marek (MDV) e o da Varicela Zoster (VZV) gE/gI deletados mostraram ser essenciais para a replicação. As glicoproteínas gI e gE formam um heterodímero responsável pela dispersão viral célula a célula, comum entre os herpes vírus (DEVLIN et al., 2006). A função da US9, proteína codificada pela ORF 9, localizada anteriormente a gE, ainda não foi totalmente investigada no ILTV. A construção deste recombinante gE/gI deletado pode ter afetado esta região, que por sua vez, pode ter impedido a replicação do vírus (DEVLIN et al., 2006).

Vários genes deletados do ILTV já foram testados *in vivo* para se observar a eficiência vacinal, entretanto o ILTV dUTPase negativo mostrou reter considerável virulência após desafio com altas doses de vírus (FUCHS et al., 2000). A virulência residual de cada uma delas deve ser muito bem estudada em paralelo a experimentos de

imunização. O sucesso desta construção se baseia no conhecimento dos mecanismos da replicação viral, entretanto este método ainda é prejudicado pela falta de células de linhagem eficientes para a propagação e manipulação do ILTV (OLDONI & GARCIA, 2007; FUCHS et al., 2007). As células LMH de linhagem são atualmente utilizadas para a co-transfecção do ILTV, entretanto o cultivo é delicado e a replicação do vírus é baixa (FUCHS et al., 2007).

Novos experimentos, com base nas funções de cada glicoproteína e/ou em conjunto devem ser realizados para o seu melhor entendimento e para futuros projetos de deleções com o propósito de atenuação de virulência. Neste sentido, o presente projeto ainda se torna importante para o melhor entendimento do papel da glicoproteína E do ILTV.

Agradecimentos

Ao apoio financeiro concedido pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de amparo a pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS). Ao apoio técnico e de infra-estrutura do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamour (IPVDF) e ao Laboratório de Virologia do ICBS/UFRGS.

Referências

- Andreasen, J.R. Jr., Glisson, J. R., Villegas, P. Differentiation of vaccine strains and Georgia field isolates of infectious laryngotracheitis virus by their restriction endonuclease fragment patterns. **Avian Diseases**, 34: 646-656, 1990.
- Barboom, S.A., Forgacs, A., Solyom, F. Development of an inactivated vaccine against laryngotracheitis (ILT)-serological and protection studies. **Avian Pathology**, 15: 213-221, 1986.
- Devlin, J.M.; Browning, G.F.; Gilkerson, J.R. A glycoprotein I and glycoprotein E deficient mutant of infectious laryngotracheitis virus exhibits impaired cell-to-cell spread in cultured cells. **Archives of Virology**, 151: 1281-1291, 2006.
- Dingwell, K.S.; Doering, L.C.; Johnson, D.C. Glycoproteins E and I facilitate neuron-to-neuron spread of Herpes Simplex Virus. **Journal of Virology**, 69: 7087-7098, 1995.
- Franco, A.C. **Recombinantes de herpes vírus bovino tipo 1 com deleções nos genes gE e US9**. Porto Alegre: UFRGS, 2001. 193p. (Tese, Doutorado em Ciências Veterinárias).
- Fuchs, W.; Ziemann, K.; Teifke, J.P.; Mettenleiter, T.C. The non-essential UL50 gene of avian laryngotracheitis virus encodes a functional dUTPase which is not a virulence factor. **Journal of General Virology**, 81: 627-638, 2000.
- Fuchs, W., Veits, J., Helferich, D., Granzow, H., Teifke, J.P., Mettenleiter, T.C. Molecular biology of avian infectious laryngotracheitis virus. **Veterinary Research**, 38: 261-279, 2007
- Garcia, M. & Riblet, S. Characterization of infectious laryngotracheitis virus isolates: Demonstration of viral subpopulations within vaccine preparations. **Avian Diseases**, 45: 558-566, 2001.

- Guy, J.S., Barnes, H.J., Morgan, L.M. Virulence of infectious laryngotracheitis viruses: comparison of modified-live vaccine viruses and North California field isolates. **Avian Diseases**, 34: 106-113, 1990.
- Han, M.G.; Kweon, C.H.; Kim, S.J. Pathogenicity and vaccine efficacy of a thymidine kinase gene deleted infectious laryngotracheitis virus expressing the green fluorescent protein gene. **Archives of Virology**, 147: 1017-1031, 2002.
- Keeler, C.L.; Kingsley, D.H.; Burton, C.R.A. Identification of the thymidine kinase gene of infectious laryngotracheitis virus. **Avian Diseases**, 35: 920-929, 1991.
- Oldoni, I. & Garcia, M., 2007. Caracterização dos vírus da laringotraqueíte infecciosa (ILTV) isolados nos Estados Unidos por PCR-RFLP de múltiplas regiões genômicas. In: XX Congresso Latinoamericano de Avicultura, Porto Alegre, Brasil, pp. 107-109.
- Roizman, B. The family Herpesviridae: General description, taxonomy and classification. In: ROIZMAN, B (Ed.). **The Herpesviruses**. New York: Plenum Press, 1982. v. 1, p.1-23.
- Sambrook, J. & Russel, D.W. Molecular cloning: a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001.
- Schnitzlein, W.; Winans, R.; Ellsworth, S.; Tripathy, D.N. Generation of thymidine kinase deficient mutants of infectious laryngotracheitis virus. **Virology**, 209: 304-314, 1995.
- Wild, M.A.; Cook, S.; Cochran, M. A genomic map of infectious laryngotracheitis virus and the sequence and organization of genes present in the unique short and flanking regions. **Virus genes**, 12: 107-116, 1996.
- Van Oirschot, J.T.; Kaashoek, M.J.; Maris-Veldhuis, M.A.; Rijsewijk, F.A. Strains of bovine herpesvirus 1 that do not express an epitope on glycoprotein E in cell culture

steal induce antibodies that can be detected in a gE-blocking ELISA. **Veterinary Microbiology**, 65:103-113, 1999.

York, J.J. & Fahey, K.J. Vaccination with affinity-purified glycoproteins protects chickens against infectious laryngotracheitis herpesvirus. **Avian Pathology**, 20: 693-704, 1991.

Tabela 1: Primers utilizados na amplificação das regiões 5' e 3' flanqueadoras da gE.

| | Seqüência dos oligonucleotídeos | Localização no genoma | Produto da amplificação (pares de base (pb)) |
|--------------------|---|-----------------------|--|
| Região 5'gE | P1: CGCCAGGATTGACGACGA P2: CCCGGCTGAATTCTCCTCCT | 12602-13752 | 1151 |
| Região 3'gE | P3: TCGGTCGTGGAGGGAGAAAGG P4: GCTACCGCCCTTGTTTCTGCAAGG | 15183-16081 | 899 |

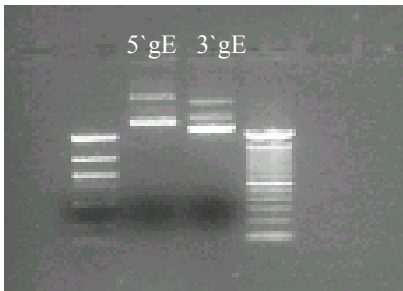


Figura 1: Plasmídeos contendo as regiões flanqueadoras 5'gE e 3'gE, marcador de peso molecular *lambda* HindIII.

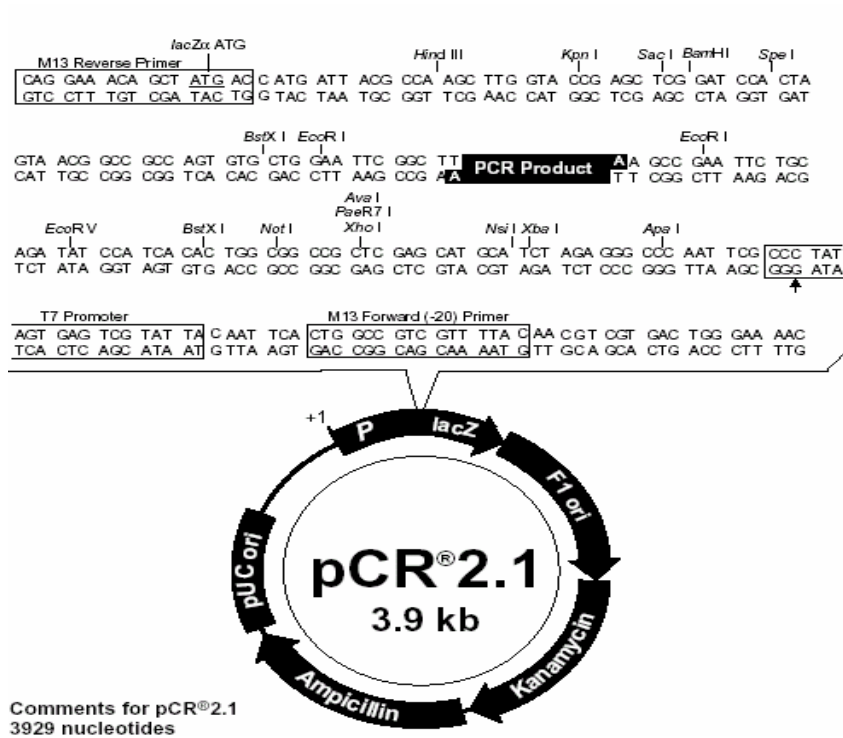


Figura 2: Esquema do plasmídeo pCR 2.1 com a localização dos sítios de clonagem.

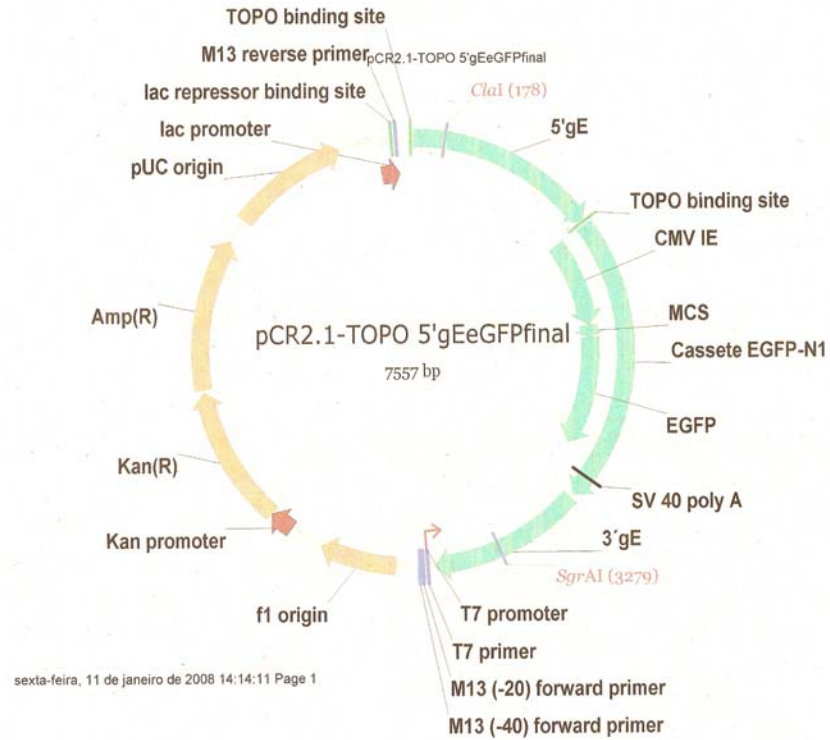


Figura 3: Esquema da construção do cassete de clonagem para posterior co-transfecção.