

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**DESENVOLVIMENTO DA TÉCNICA DE RT-PCR EM TEMPO
REAL PARA DETECÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DE ESTIRPES
DO VÍRUS DA BRONQUITE INFECCIOSA DAS GALINHAS**

Cintia Hiromi Okino
Médica Veterinária

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
Fevereiro de 2007

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**DESENVOLVIMENTO DA TÉCNICA DE RT-PCR EM TEMPO
REAL PARA DETECÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DE ESTIRPES
DO VÍRUS DA BRONQUITE INFECCIOSA DAS GALINHAS**

Cintia Hiromi Okino

Orientador: Prof. Dr. Hélio José Montassier

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP – Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária (Patologia Animal).

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
Fevereiro de 2007

O41d Okino, Cintia Hiromi
Desenvolvimento da técnica de RT-PCR em tempo real para a
detecção e diferenciação de estirpes do vírus da bronquite infecciosa
das galinhas/ Cintia Hiromi Okino. – -Jaboticabal, 2007
xx, 104 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2007
Orientador: Hélio José Montassier
Banca examinadora: Adolorata Aparecida Bianco Carvalho e
Clarice Weins Arns
Bibliografia

1. Bronquite Infecciosa Aviária. 2. Diagnóstico. 3. Patologia
Aviária. 4. PCR em tempo real. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616.988.73:636.5

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.
E-mail do autor: c_okino@yahoo.com.br

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

CINTIA HIROMI OKINO – nascida em São Paulo, no dia 07 de agosto de 1982, graduou-se em Medicina Veterinária pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista (FCAV – UNESP), Câmpus de Jaboticabal, em janeiro de 2005. Entre dezembro de 2000 e julho de 2002 realizou estágio e trabalho de iniciação científica na área de bioquímica de plantas e microorganismos, sob orientação da Profa. Dra. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos, professora titular do Departamento de Tecnologia da FCAV – UNESP – Câmpus de Jaboticabal. Entre agosto de 2002 e junho de 2004 desenvolveu trabalho de iniciação científica na área de biologia molecular, sob orientação do Prof. Dr. Hélio José Montassier, do Departamento de Patologia Animal da FCAV – UNESP – Câmpus de Jaboticabal. Nos junho a agosto de 2004 realizou estágio de graduação na área de Sanidade Animal, no Centro Nacional de Pesquisa de Suínos e Aves (CNPISA), órgão da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), sob supervisão da Dra. Liana Brentano. Em 2004, desenvolveu a monografia de conclusão de curso intitulada “Desenvolvimento e aplicação das técnicas de RT-PCR e Semi-Nested-RT-PCR para a detecção e identificação do vírus da bronquite infecciosa das galinhas” orientada pelo Prof. Dr. Hélio José Montassier.

Dedico

Aos meus pais,

Tudo o que eu sou, todas as coisas que um dia sonhei alcançar e que hoje se tornaram realidade, eu devo a vocês. Não existem palavras, gestos nem fortuna no mundo com que eu possa lhes retribuir, sou muito grata por tudo que vocês fizeram e ainda fazem por mim.

À minha família,

Em especial à minha Vózinha Nair, uma das melhores pessoas que eu já conheci, melhor em generosidade e integridade, um exemplo de vida.

A Clá, são inúmeras as diferenças entre a gente, mas a minha vida sem você jamais seria a mesma, tenho você como uma grande amiga e que nunca faltará.

Ao Thiago,

Meu amigo e companheiro, devo muito desse trabalho a você, que caminha ao meu lado desde o começo desta etapa, aprendo muito com você a cada dia que passa, e isso me torna uma pessoa melhor. Obrigada por todo carinho e paciência.

AGRADECIMENTOS

A Deus,

Por ter sempre iluminado meu caminho e permitido cumprir mais esta etapa.

Ao Prof. Hélio José Montassier,

A quem tenho como um exemplo profissional.

Pela amizade, confiança, por acreditar em meu esforço e trabalho, pela orientação e oportunidade de ter desenvolvido mais este trabalho.

Aos amigos do Laboratório, que já saíram ou ainda continuam por lá: Aliandra, Aline Frasseto, Aline Caetano, Andressa, Camila, Cibele, Daniel, Denise, Igor, Juliana, Mariana, Fátima, Lurdinha, Márcia, Nicole, Renato, Telma, Tyta e Vanessa,

Pelo auxílio durante meu experimento e principalmente pelos bons momentos de convivência.

Aos amigos,

Aos amigos de longe (Tocera e Kronka, eu nunca irei me esquecer de vocês, apesar da longa distância!).

Aos amigos não nominalmente citados, conquistados nesse período ou não, da república e aqueles amigos da XLI Turma de Medicina Veterinária que continuam fazendo parte da minha vida, que certamente, e até muitas vezes sem saber, ajudaram-me a vencer muitas barreiras.

À Profa. Eliana G. M. Lemos,

Por ter me incentivado e introduzido à Biologia Molecular e pelo empréstimo do aparelho de PCR em tempo real para a realização deste experimento.

Aos membros das bancas examinadoras dos exames de qualificação e defesa: Profa. Dra. Adolorata Bianco Carvalho, Prof. Dr. Antônio Carlos Alessi e Profa. Dra. Clarice Weins Arns,

Pelas sugestões dadas e que contribuíram para melhorar este trabalho.

Ao Prof. João Ademir,

Pelo auxílio com as análises estatísticas deste trabalho.

À bibliotecária Tieko T. Sugahara,

Pelas correções das referências bibliográficas.

À Unesp – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias,

Pela oportunidade oferecida para a realização do curso.

Ao grupo Frango Sertanejo - Ipiguá,

Pela doação das aves.

À Merial,

Pela doação dos ovos embrionados SPF.

À FAPESP,

Pela concessão da bolsa de Mestrado.

Ao CNPq,

Pelo financiamento deste projeto.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, colaboraram com a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
3. OBJETIVOS	11
4. MATERIAL E MÉTODOS	12
4.1 Vírus	12
4.2 Propagação viral em ovos embrionados	13
4.3 Determinação da infectividade viral das estirpes M41 e H120	15
4.4 Infecção experimental	15
4.4.1 Infecção experimental em aves com a estirpe M41 do VBI	15
4.4.2 Infecção experimental em aves com a estirpe vacinal H120 do VBI	16
4.5 Isolamento viral em ovos embrionados SPF	16
4.6 Extração de RNA genômico	18
4.7 Primers	19
4.8 Reação de transcrição reversa (RT)	20
4.9 Reação em cadeia da polimerase (PCR)	21
4.10 Eletroforese em gel de agarose	21
4.11 PCR em tempo real	22
4.12 Determinação da especificidade analítica	23
4.13 Determinação da sensibilidade analítica	23
4.13.1 Determinação da sensibilidade analítica (LCA)	23
4.13.2 Determinação da sensibilidade analítica (cDNA)	23
4.13.3 Determinação da sensibilidade analítica (DNA plasmídeo) e construção da curva padrão	24
4.14 Alinhamento de seqüências do VBI cadastradas no Genbank para relacionar dados de T _m com as das regiões gênicas de S1 testadas	24
4.15 Análise estatística	25
4.15.1 Diferenciação entre estirpes do VBI através de análises da temperatura de dissociação	25

4.15.2 <i>Comparação da detecção entre os testes de biologia molecular e o teste padrão de isolamento viral</i>	25
5. RESULTADOS	26
5.1 Detecção de diferentes estirpes do VBI por RT-PCR convencional.....	26
5.2 Detecção e diferenciação de estirpes do VBI através da técnica de RT-PCR em tempo real e análises das curvas de dissociação	28
5.2.1 <i>Análise estatística das temperaturas de dissociação obtidas</i>	38
5.3 Relação entre os grupos discriminados pela rt RT-PCR e o alinhamento de estirpes do VBI com base nas seqüências de nucleotídeos das regiões HRV1 e HRV2 do gene S1	41
5.4 Avaliação da sensibilidade analítica.....	47
5.4.1 <i>Avaliação da sensibilidade analítica a partir do LCA infectado com a estirpe M41 do VBI</i>	47
5.4.2 Avaliação da sensibilidade analítica a partir do cDNA da estirpe M41 do VBI	47
5.4.3 Avaliação da sensibilidade analítica a partir do DNA plasmideal da estirpe M41 do VBI e construção da curva padrão.....	48
5.5 Determinação da especificidade analítica	55
5.6 Detecção do VBI em aves infectadas experimentalmente com M41.....	58
5.7 Detecção do VBI em aves infectadas experimentalmente com vacina comercial atenuada.....	67
5.8. Comparação da detecção entre os testes de RT-PCR convencional e rt RT-PCR e o teste padrão de isolamento viral na detecção do VBI em amostras colhidas das aves infectadas experimentalmente com a estirpe M41	71
6 DISCUSSÃO	72
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	85
8 CONCLUSÕES	86
9 REFERÊNCIAS.....	87
APENDICE.....	98

LISTA DE ABREVIATURAS

A - Adenina

BIG – Bronquite Infecciosa das Galinhas

C – Citosina

C.E. – Crescimento exponencial

CG – Citosina e Guanina

CT – “Threshold Cycle”

DEPC – Dietil-pirocarbonato

DIE – Dose Infectante Embrionária

DNA – Ácido desoxirribonucléico

Dpi – dia pós-infecção

DTT - Dithiothreitol

FAO – “Food and Agriculture Organization” - Organização para a Agricultura e Alimentação

G - Guanina

H120 – Holland 120

H52 – Holland 52

HI – Inibição da Hemaglutinação

HRV1 – Região de hipervariabilidade gênica 1

HRV2 – Região de hipervariabilidade gênica 2

IV – Isolamento Viral

Kb – Quilobases ou 1000 unidades de bases

LCA – Líquido Cório Alantóide

OIE – Organização Mundial de Saúde Animal

OMS – Organização Mundial de Saúde

M41 – Massachussets 41

ng - Nanograma

pb – Pares de bases

PCR – “Polimerase Chain Reaction” - Reação em Cadeia da Polimerase

pg - Picograma

pi – Pós Infecção

RNA – Ácido ribonucléico

RT- “Reverse transcription” - Transcrição Reversa

rt RT-PCR – Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real

S – “Spike” - Glicoproteína de Superfície

SPF – “Specific Pathogen Free” – Livre de patógenos específicos

T - Timina

TA – Temperatura Ambiente

Tm – “Melting temperature” – Temperatura de dissociação

Tm E – Temperatura de dissociação específica

TPB – “Tryptose Phosphate Broth” – Caldo Triptose Fosfato

VBI – virus da Bronquite Infecciosa

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Estirpes virais do VBI utilizadas, classificação quanto ao sorotipo e número de acesso no GenBank	14
Tabela 2. Nomenclatura, localização e procedência dos “primers” utilizados neste estudo e respectivos fragmentos amplificados.....	19
Tabela 3. Valores médios e respectivos desvios padrão de fluorescência e C(T) obtidos a partir da PCR em tempo real com amostras processadas com ou sem a adição de DTT durante a RT.....	29
Tabela 4. Valores de T _m obtidos a partir da RT-PCR em tempo real com uso dos “primers” W+/W-, e relação com a porcentagem de Citosina + Guanina (CG) e tamanho esperado dos fragmentos amplificados em pares de bases (pb) com base em seqüências gênicas que se encontram cadastradas no GenBank.....	33
Tabela 5. Valores de T _m obtidos a partir da RT-PCR em tempo real com uso dos “primers” HV+/HV-, e relação com a porcentagem de Citosina + Guanina (CG) e tamanho esperado dos fragmentos amplificados em pares de bases (pb) com base em seqüências cadastradas no GenBank.....	37
Tabela 6. Análise estatística das T _m s obtidas a partir da dissociação realizada após a rt RT-PCR com uso dos “primers” W+/W- pelo teste de Scott Knott (1974)	39
Tabela 7. Análise estatística das T _m s obtidas a partir da dissociação realizada após a rt RT-PCR com uso dos “primers” HV+/HV- pelo teste de Scott-Knott (1974)...	40
Tabela 8. Estirpes do VBI utilizadas no alinhamento através do programa computacional BioEdit, respectivos números de acesso no GenBank e porcentagens de Citosina + Guanina (CG) dos fragmentos amplificados pelo uso dos pares de “primers” W+/W- e HV+/HV- (regiões gênicas HRV1 e HRV2 do gene S1).....	42
Tabela 9. Freqüência de detecção do VBI através dos métodos de isolamento viral (IV)a, RT-PCR convencionalb e RT-PCR em tempo realc em amostras de traquéia e pulmão de aves experimentalmente infectadas com a estirpe M41, nos diferentes dias pós-infecção (dpi).....	66

Tabela 10. Frequência de detecção do VBI através dos métodos de isolamento viral (IV)^a, RT-PCR convencional^b e RT-PCR em tempo real^c em amostras de traquéia e pulmão de aves vacinadas, nos diferentes dias pós-infecção (dpi).....70

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Representações esquemáticas do genoma do VBI, gene S e subunidades S1 e S2 e regiões de hipervariabilidade gênica 1 e 2 (HRV1 e HRV2), com respectivas combinações de “primers”.....	20
Figura 2. Detecção de diferentes estirpes do VBI testadas pela técnica de RT-PCR convencional.....	27
Figura 3. Resultados obtidos a partir do teste da influência do DTT na rt RT-PCR com uso dos “primers” HV+ / HV-	29
Figura 4. Curvas de amplificação obtidas na PCR em tempo real com uso dos “primers” W+/W-, relativas às diferentes estirpes do VBI testadas.	30
Figura 5. Curvas de dissociação obtidas na PCR em tempo real com a utilização dos “primers” W+/W-, relativas às diferentes estirpes do VBI testadas.....	31
Figura 6. Curvas de dissociação obtidas na PCR em tempo real com uso dos “primers” W+/W-, relativas a quatro estirpes de referência do VBI testadas (Connecticut, H120, H52 e M41)	31
Figura 7. Curva de dissociação da reação de PCR em tempo real com a utilização dos “primers” W+ / W-, com as diferentes estirpes do VBI testadas (JMK, SE 17, Ma5, Iowa 97 e M41).....	32
Figura 8. Curvas de dissociação obtidas na PCR em tempo real com uso dos “primers” W+/W-, relativas às diferentes estirpes do VBI testadas (presença de dois picos de dissociação da estirpe VBIPR05)	32
Figura 9. Curvas de amplificação da PCR em tempo real com uso dos “primers” HV+/HV-, relativas às diferentes estirpes do VBI testadas.....	34
Figura 10. Curvas de dissociação da PCR em tempo real com uso dos “primers” HV+/HV-, relativas às diferentes estirpes do VBI testadas.....	34
Figura 11. Curvas de dissociação da PCR em tempo real com uso dos “primers” HV+/HV-, relativas a seis estirpes do VBI testadas (M41, Iowa 609, Ma5, H52, H120 e SE 17).....	35

Figura 12. Curvas de dissociação da PCR em tempo real com uso dos “primers” HV+/ HV-, relativas às estirpes do sorotipo Massachussets	35
Figura 13. Curvas de dissociação da PCR em tempo real com uso dos “primers” HV+/HV-, relativas a seis estirpes do VBI (M41, H120, Ma5, H52, Connecticut e SE 17)	36
Figura 14. Alinhamento das seqüências gênicas do VBI cadastradas no GenBank (estirpes de referência e isolados de campo brasileiros) relativas a amplificação por rt RT-PCR através do uso dos “primers” W+/W- realizado no programa computacional BioEdit.....	43
Figura 15. Árvore filogenética da região gênica amplificada pelos “primers” W+/W- de estirpes do VBI cadastradas no GenBank, construída através do uso do programa computacional Clustal W.....	44
Figura 16. Alinhamento das seqüências gênicas do VBI cadastradas no GenBank (estirpes de referência e isolados de campo brasileiros) relativas a amplificação por rt RT-PCR através do uso dos “primers” HV+/HV- realizado no programa computacional BioEdit.....	45
Figura 17. Árvore filogenética da região gênica amplificada pelos “primers” HV+/HV- de estirpes do VBI cadastradas no GenBank, construída através do uso do programa computacional Clustal W.....	46
Figura 18. Avaliação da sensibilidade analítica da RT-PCR convencional e da RT-PCR em tempo real, em relação a estirpe M41 do VBI. O LCA foi submetido a diluições seriadas de razão 10 (10^0 a 10^{-10}) e então processado pelas técnicas de RT-PCR em tempo real e RT-PCR convencional.....	49
Figura 19. Valores (média e desvio padrão) obtidos a partir da rt RT-PCR com uso dos “primers” HV+/HV- no teste de sensibilidade analítica a partir da diluição do LCA infectado com a estirpe M41	50
Figura 20. Avaliação da sensibilidade analítica da RT-PCR convencional e da RT-PCR em tempo real em relação a estirpe M41 do VBI. O cDNA foi submetido a diluições seriadas de razão 10 (10^0 a 10^{-10}) e então processado pelas técnicas de RT-PCR em tempo real e RT-PCR convencional.....	51

Figura 21. Valores (média e desvio padrão) obtidos a partir da rt RT-PCR com uso dos “primers” HV+/HV- no teste de sensibilidade analítica a partir da diluição do cDNA da estirpe M41	52
Figura 22. Avaliação da sensibilidade analítica da RT-PCR convencional e da RT-PCR em tempo real em relação a estirpe M41 do VBI. O DNA plasmideal foi submetido a diluições seriadas de razão 10 (10^0 a 10^{-11}) e então processado pelas técnicas de RT-PCR em tempo real e RT-PCR convencional.....	53
Figura 23. Valores (média e desvio padrão) obtidos a partir da rt RT-PCR com uso dos “primers” HV+/HV- no teste de sensibilidade analítica a partir da diluição do DNA plasmideal da estirpe M41	54
Figura 24. A curva padrão foi gerada através do uso dos valores de C(T) vs. Log ₁₀ das diluições seriadas de razão 10 (10^{-3} a 10^{-9}) do DNA plasmideal correspondente ao gene S1 do VBI	55
Figura 25. Teste de especificidade analítica da RT-PCR em tempo-real e a convencional com uso dos “primers” HV+ / HV-.....	56
Figura 26. Fluorescência obtida a partir da amplificação por RT-PCR em tempo real com a utilização dos “primers” HV+/HV- para diferentes vírus.....	57
Figura 27. Fotos ilustrando a presença de lesões em embriões provenientes do isolamento viral a partir de amostras de infecção experimental com a estirpe M41 do VBI	59
Figura 28. Detecção do VBI em aves experimentalmente infectadas com a estirpe M41 por RT-PCR convencional com os “primers” HV+ e HV-.....	60
Figura 29. Curvas de amplificação da RT-PCR em tempo real com uso dos “primers” HV+/HV- a partir de amostras de pulmão das aves experimentalmente infectadas com a estirpe M41 do VBI	61
Figura 30. Curvas de dissociação da RT-PCR em tempo real com uso dos “primers” HV+/HV- a partir de amostras de pulmão das aves experimentalmente infectadas com a estirpe M41 do VBI.....	61

Figura 31. Detecção do VBI por rt RT-PCR com uso dos “primers” HV+/HV- em amostras de pulmão das aves infectadas experimentalmente com estirpe M41 da BIG.....	62
Figura 32. Curvas de amplificação da RT-PCR em tempo real com uso dos “primers” HV+/HV- a partir de amostras de traquéia das aves experimentalmente infectadas com a estirpe M41 do VBI	63
Figura 33. Curvas de dissociação da RT-PCR em tempo real com uso dos “primers” HV+/HV- a partir de amostras de traquéia das aves experimentalmente infectadas com a estirpe M41 do VBI.....	63
Figura 34. Detecção do VBI por rt RT-PCR com uso dos “primers” HV+/HV- em amostras de traquéia das aves infectadas experimentalmente com estirpe M41 da BIG	64
Figura 35. Detecção do VBI nos diferentes dias pós infecção, em aves com presença ou na ausência de sinais clínicos, através das diferentes técnicas utilizadas	65
Figura 36. Detecção do VBI em aves experimentalmente vacinadas, com uso dos “primers” HV+/HV-.....	68
Figura 37. Detecção do VBI por rt RT-PCR com uso dos “primers” HV+/HV- em amostras de traquéia e de pulmão colhidas das aves infectadas com a estirpe H120 do VBI	69

LISTA DO APÊNDICE

	Página
<p>Tabela 1. Valores de fluorescência, C(T) e T_m obtidas a partir de amostras do teste de sensibilidade analítica a partir da diluição do LCA infectado com a estirpe M41 do VBI por rt RT-PCR com uso dos “primers” HV+/HV-, e avaliações quanto a presença de crescimento exponencial durante a curva de amplificação e especificidade da T_m obtida.....</p>	98
<p>Tabela 2. Valores de fluorescência, C(T) e T_m obtidas a partir de amostras do teste de sensibilidade analítica a partir da diluição do cDNA da estirpe M41 por rt RT-PCR com uso dos “primers” HV+/HV-, e avaliações quanto a presença de crescimento exponencial durante a curva de amplificação e especificidade da T_m obtida</p>	99
<p>Tabela 3. Valores de fluorescência, C(T) e T_m obtidas a partir de amostras do teste de sensibilidade analítica a partir da diluição do DNA plasmideal da estirpe M41 por rt RT-PCR com uso dos “primers” HV+/HV-, e avaliações quanto a presença de crescimento exponencial durante a curva de amplificação e especificidade da T_m obtida.....</p>	100
<p>Tabela 4. Valores de fluorescência, C(T) e T_m obtidos através da amplificação por PCR em tempo real com a utilização do par de “primers” HV+ / HV- a partir do vírus da Bronquite infecciosa e dos vírus heterólogos testados (pneumovirus, vírus da doença de Newcastle e vírus da doença de Gumboro) e avaliações quanto a presença de crescimento exponencial durante a curva de amplificação e especificidade da T_m obtida.....</p>	101
<p>Tabela 5. Valores de fluorescência, C(T) e T_m obtidas a partir de amostras de pulmão das aves experimentalmente infectadas com a estirpe M41 do VBI amplificadas por rt RT-PCR com os “primers” HV+ e HV-, e avaliações quanto a</p>	

presença de crescimento exponencial durante a curva de amplificação e especificidade da Tm obtida..... 102

Tabela 6. Valores de fluorescência, C(T) e Tm obtidas a partir de amostras de traquéia de aves experimentalmente infectadas com a estirpe M41 do VBI amplificadas por rt RT-PCR com os “primers” HV+ e HV-, e avaliações quanto a presença de crescimento exponencial durante a curva de amplificação e especificidade da Tm obtida..... 103

Tabela 7. Valores de fluorescência, C(T), e Tm obtidas a partir de amostras de pulmão e de traquéia colhidas das aves experimentalmente infectadas com a estirpe vacinal H120 do VBI amplificadas por rt RT-PCR com o uso dos “primers” HV+/HV-, e avaliações quanto a presença de crescimento exponencial durante a curva de amplificação e especificidade da Tm obtida 104

DESENVOLVIMENTO DA TÉCNICA DE RT-PCR EM TEMPO REAL PARA A DETECÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DE ESTIRPES DO VÍRUS DA BRONQUITE INFECCIOSA DAS GALINHAS

RESUMO

A bronquite infecciosa das galinhas (BIG) é uma doença infecciosa que está amplamente disseminada entre as criações avícolas brasileiras e é uma das enfermidades virais que mais têm causado perdas econômicas na atualidade. Portanto, a rápida detecção e identificação do agente causal são imprescindíveis para que medidas eficazes de controle sejam prontamente tomadas. Para tanto, é necessário que os métodos de diagnóstico empregados sejam sensíveis, específicos, rápidos e também de baixo custo. Nesse contexto, a técnica de RT-PCR em tempo real abordada no presente estudo permitiu a amplificação de duas regiões de hipervariabilidade do gene S1 de 17 estirpes diferentes do vírus da BIG (VBI), que foram testadas, mas não foi capaz de amplificar nenhum dos RNAvírus heterólogos analisados (vírus da doença de Newcastle, pneumovírus aviário e vírus da doença de Gumboro). Com essa mesma técnica foi possível fazer a diferenciação em grupos geneticamente distintos, de estirpes do VBI através de análises das curvas de dissociação de fragmentos amplificados a partir das regiões de hipervariabilidade gênica I e II do gene S1. A RT-PCR em tempo real desenvolvida apresentou maior sensibilidade na detecção do VBI em amostras teciduais, quando comparada à técnica padrão de Isolamento Viral em ovos embrionados de galinha. Ambas as técnicas de RT-PCR, convencional e em tempo real, revelaram a presença do VBI em amostras colhidas em todos os intervalos pós-infecção experimental avaliados, abrangendo tanto a fase aguda como a de convalescença dessa doença. Portanto, a técnica de RT-PCR em tempo real aqui utilizada, demonstrou alta sensibilidade, rapidez e especificidade na detecção do VBI, além de permitir a diferenciação entre estirpes desse vírus.

Palavras-chave: Bronquite Infecciosa das galinhas, Diagnóstico, Patologia Aviária, PCR em tempo real, SYBR Green I, Virologia

DEVELOPMENT OF THE REAL-TIME RT-PCR FOR DETECTION AND DIFFERENTIATION OF AVIAN INFECTIOUS BRONCHITIS VIRUS STRAINS

ABSTRACT

The avian infectious bronchitis virus (IBV) is an infectious disease widely spread in Brazilian commercial poultries where causes significant economical losses. Rapid and accurate diagnosis of the IBV strain involved in a field outbreak is necessary to establish an effective control of this disease. The real-time RT-PCR performed in this study to amplify two hypervariable regions of S1 gene, was able to detect 17 IBV strains, e.g., nine reference strains (including Massachusetts, Connecticut, JMK, SE 17 and Iowa serotypes) and eight Brazilian field isolates, whilst non-related avian viral pathogens such as Newcastle disease virus, Avian Pneumovirus and Gumboro disease virus were not detected. The differentiation between IBV strains was accomplished using the melting curve analysis of the amplified fragments corresponding to the hypervariable regions I and II of S1 gene. The real-time RT-PCR developed here showed a higher rate of IBV detection in tissue samples of experimentally infected chickens, when compared to the gold-standard technique of Viral Isolation in embryonated chicken eggs, and the same rate of detection was found for the conventional RT-PCR. Both conventional and the real-time RT-PCR techniques proved to be able to detect IBV in tissue samples collected in acute and convalescent phases of IBV pos-infection as well as in all samples collected from chickens experimentally infected with the commercial vaccine strain. Therefore, the real-time RT-PCR technique demonstrated a high sensitivity, rapidity and specificity for IBV detection and it was capable to discriminate the strains or field isolates in different genetic groups, contributing significantly to the direct diagnosis of IBV.

Key-words: Avian Infectious Bronchitis, Real-time PCR, SYBR Green I, Avian Pathology, Virology, Diagnostic

1 INTRODUÇÃO

A bronquite infecciosa das galinhas (BIG) é causada por um RNAvírus de fita simples com polaridade positiva e que pertence à família *Coronaviridae*, gênero *Coronavirus*, e pode ser definida como uma enfermidade viral altamente contagiosa e de curto período de incubação, que acomete as galinhas causando predominantemente lesões respiratórias que se manifestam clinicamente e invariavelmente por espirros e estertores tráqueo-bronquiolares e, às vezes, na dependência da estirpe ou patotipo viral, podem ser induzidas conjuntivite, sinusite, nefrite, nefrose, epididimite e metrite, com sinais clínicos, nesse caso, como “cabeça inchada”, uremia e redução da fertilidade e da produção de ovos.

A BIG está incluída na lista da OIE (Organização Mundial de Saúde Animal), FAO (Organização para a Agricultura e Alimentação) e OMS (Organização Mundial de Saúde) como doença transmissível de notificação anual, que tem importância sócio-econômica e implicações sanitárias, podendo trazer alguma repercussão a qualquer momento no comércio internacional de produtos e animais.

No Brasil, a BIG está amplamente disseminada entre as criações avícolas comerciais e é uma das enfermidades virais que mais têm causado perdas econômicas, na atualidade. Portanto, a rápida detecção e identificação do patógeno viral são imprescindíveis para que medidas eficazes de controle sejam prontamente tomadas. Para tanto, é necessário que os métodos de diagnóstico empregados sejam bastante sensíveis, específicos, rápidos e também de baixo custo. Nesse contexto, as técnicas de biologia molecular que se baseiam na pesquisa do genoma viral têm-se revelado bastante sensíveis e específicas, como a Transcrição Reversa (RT) seguida da reação em Cadeia de Polimerase (PCR). Em adição a isso, deve-se salientar que o advento da técnica de PCR em tempo real trouxe algumas melhorias marcantes em relação à

técnica de PCR convencional, como o aumento da rapidez e a redução do risco de contaminação laboratorial com produtos amplificados, por não necessitar da manipulação dos produtos da técnica de PCR, dentre outros aspectos vantajosos.

No tocante à técnica de PCR em tempo real, sabe-se que existem diferentes marcadores fluorescentes utilizados e, dentre eles, o SYBR Green I foi o preferido para a realização deste experimento, devido ao menor custo e à maior praticidade. Assim, no sentido de tornar disponíveis métodos de biologia molecular alternativos para a realização do diagnóstico laboratorial da BIG de forma mais efetiva, rápida e menos onerosa, o presente estudo foi desenvolvido, visando fazer a padronização e a aplicação do método de RT-PCR em tempo real para detecção e diferenciação em grupos genéticos de estirpes do VBI a partir de amostras teciduais de aves ou de líquido cório-alantóide proveniente de ovos embrionados infectados, avaliando-se, comparativamente, a performance deste método com a técnica de RT-PCR convencional e com o teste padrão de isolamento viral em ovos embrionados SPF (“Specific Pathogen Free”).

2 REVISÃO DE LITERATURA

O Coronavirus aviário é o agente etiológico causador da bronquite infecciosa das galinhas (BIG), uma doença aguda e altamente infecciosa que acomete aves de ambos os sexos e das mais diferentes idades, seja na criação para a produção de frangos de corte ou para a produção de ovos. Essa enfermidade ocorre em praticamente todas as regiões do mundo, onde existe a avicultura industrial, sendo extremamente difícil o seu controle devido à existência de múltiplos sorotipos e variantes do vírus que podem não responder à proteção cruzada total induzidas pelas estirpes de referencia vacinal. Esta enfermidade foi descrita pela primeira vez em Dakota do Norte, nos Estados Unidos, em 1930 (CAVANAGH & NAQI, 2003; CAPUA et al., 1999; DI FÁBIO & ROSSINI, 2000). No Brasil, foi identificada pela primeira vez em 1957 por Hipólito et al. (1973).

O vírus da bronquite infecciosa das galinhas (VBI) pertence à ordem *Nidovirales*, família *Coronaviridae*, gênero *Coronavirus* (grupo III) (CAVANAGH et al., 1994). O genoma deste vírus é composto por RNA de fita simples, não segmentado, com sentido positivo e 27,6 Kilobases (Kb) de comprimento (BOURSNELL et al., 1987). Três diferentes genes são responsáveis por codificar as principais proteínas estruturais deste vírus, isto é, a glicoproteína de superfície (S), a glicoproteína da matriz (M) e a proteína do nucleocapsídeo (N) (STERN & KENNEDY, 1980; STURMAN et al., 1980; CAVANAGH, 1981; SIDDEL et al., 1982; 1983; STERN & SEFTON, 1982; STURMAN & HOLMES, 1983; LAI & CAVANAGH, 1997; CALLISON et al., 2006).

A glicoproteína S se constitui na principal proteína estrutural do VBI, que está presente como um conjunto de projeções no envoltório externo viral, formando uma coroa proeminente, e é composta de duas subunidades, S1 com 520 aminoácidos, e S2, com 625 aminoácidos (CAVANAGH & NAQI, 2003). O gene codificador da glicoproteína S é muito diversificado em termos de sua seqüência de nucleotídeos e,

por conseguinte, na estrutura primária da proteína que ele codifica, especialmente na parte S1 (CAVANAGH, 1995). As mutações no gene da glicoproteína S determina o surgimento de novas variantes e até mesmo sorotipos desse mesmo vírus, sendo que a diferenciação das estirpes do VBI fundamenta-se na identificação da região variável do gene ou da proteína S, no que concerne tanto à caracterização genética como antigênica das diferentes estirpes do VBI.

Há também evidências de que ocorre recombinação natural entre os genomas de diferentes estirpes do VBI (KUSTERS et al., 1990; WANG, et al., 1993; JIA et al., 1995). Dessa forma, como consequência de mutações e de recombinações gênicas, aparecem mais variações genéticas que se refletem em alterações fenotípicas, ou antigênicas ou biológicas, que são encontradas entre as diversas estirpes do VBI.

Ainda, sabe-se que os sítios antigênicos mais importantes, isto é, aqueles que estão associados à indução de anticorpos neutralizantes, encontram-se situados, na sua maior parte, no polipeptídeo S1 (KANT et al., 1992). Tais sítios antigênicos são essenciais para o desenvolvimento da proteção específica imune (IGNJATOVIC & GALLI, 1994). Experimentos de vacinação e desafio sugerem que o grau de proteção cruzada entre as estirpes do VBI diminui à medida que as diferenças entre as seqüências de S1 aumentam (CAVANAGH & NAQI, 2003).

A BIG ocorre sob quatro formas clínicas e anatomopatológicas diferentes. Quando são acometidas aves durante as primeiras semanas de vida, são mais comumente observados os sintomas respiratórios caracterizados por espirros, estertores úmidos da traquéia, com elevadas morbidade e mortalidade. Nas poedeiras e reprodutoras, a enfermidade ocasiona queda de postura (5% a 30%) e/ou produção de ovos defeituosos (casca mole, rugosa, despigmentada), sem, entretanto, haver uma mortalidade significativa. Nos frangos de corte, pode ocorrer sob a forma de nefrite-nefrose, havendo aumento acentuado dos rins, diarreia aquosa e morbidade e mortalidade variáveis (5% a 20%). Ainda, nas poedeiras e reprodutoras, durante a fase de recria, pode haver a manifestação tardia de urolitíase e a completa atrofia renal, sendo que a morbidade e a mortalidade são variáveis (2% a 10%) (SILVA, 1989; CAVANAGH & NAQI, 2003; DI FÁBIO & ROSSINI, 2000).

A patogenia do VBI é variável, em termos de tropismo tecidual, mas no geral, é bastante freqüente o acometimento, em maior ou menor grau, do trato respiratório. Contudo, na dependência da estirpe viral, espécie e idade das aves e condições ambientais, o indivíduo acometido pode não apresentar sinais clínicos respiratórios. Assim, na patogenia da infecção pelo VBI, é característico, no geral, ocorrer uma viremia, depois de haver a invasão e infecção inicial no epitélio traqueal, o que contribui para a maior disseminação deste vírus para os órgãos viscerais, onde este patógeno pode ou não persistir e, também, para a gênese de lesões nestes locais. A transmissão desse agente infeccioso, por seu turno, depende do contato direto ou indireto entre a ave doente ou mesmo infectada e assintomática e as aves sadias, sendo, tal como explanado anteriormente, nestas aves infectado primeiramente o tecido epitelial do trato respiratório superior. Aves de todas as idades são susceptíveis, embora a doença seja mais severa em aves jovens, nas quais este vírus pode causar uma mortalidade significativa (DI FÁBIO, 1993; CAVANAGH & NAQI, 2003; DI FÁBIO & ROSSINI, 2000).

No Brasil, a BIG tem ocorrido com grande freqüência na Serra Gaúcha, Oeste de Santa Catarina, Sudoeste, Oeste e Norte do Paraná, além do Sul e Norte de São Paulo e Triângulo Mineiro. Várias empresas têm relatado grandes prejuízos causados pelo aumento de problemas respiratórios e de lesões musculares em frangos de corte com mais de 28 dias de idade, causando importantes perdas por condenação total ou parcial de carcaça no momento do abate (ASSAYAG, 2004).

Essa enfermidade, quando acomete matrizes pesadas, pode induzir o desenvolvimento de quadros de necrose do músculo peitoral profundo a partir da 28^a semana de idade, provocando quedas de produção significativas, e um baixo número de pintinhos produzidos por ave alojada, sendo encontrados casos com queda na densidade de ovos, aumentando o número de ovos trincados e quebrados, além de albúmen liquefeito e diminuição da qualidade das aves neonatas oriundas destes ovos (ASSAYAG, 2004).

Além disso, em matrizes pesadas e aves de postura comercial, tem sido observado um aumento significativo dos problemas de “cabeça inchada”, peritonites e salpingites resultantes de infecções secundárias à bronquite infecciosa, e, em alguns

casos precipitadas por uma maior susceptibilidade aos quadros de enterite. Todos estes casos descritos acarretam um aumento relevante no consumo de antibióticos, incrementando às perdas financeiras, além de dificultar o manejo para se conseguir cumprir o período máximo permitido para a retirada desses fármacos antes do abate, o qual foi estabelecido e/ou é recomendado pela legislação em vigor. Assim, deve ficar claro que a bronquite infecciosa das galinhas está presente em grande parte das empresas avícolas brasileiras e, provavelmente, é a enfermidade viral que tem causado perdas econômicas mais relevantes na atualidade (ASSAYAG, 2004).

Os métodos de diagnóstico convencionais do VBI são baseados no isolamento viral em ovos embrionados SPF (GELB, 1989; OWEN et al., 1991) ou em culturas celulares (HOPKINS et al., 1974), seguidos da identificação antigênica dos vírus isolados. Três ou mais passagens em ovos embrionados são geralmente necessárias para o isolamento primário do VBI, o que torna tais procedimentos mais onerosos e demorados. É conhecido, também, que somente estirpes adaptadas à passagem em ovos induzem nanismo e enrolamento embrionário evidente, e que alguns isolados de campo do VBI não induzem lesões embrionárias características durante várias passagens (RAJ et al., 2004).

Uma outra alternativa é o isolamento do VBI a partir da inoculação em anéis traqueais de embriões SPF, a qual se revelou uma técnica bastante sensível (COOK et al., 1976), mas também muito laboriosa e demorada. Esse método pode ser associado à reação de imunofluorescência direta em culturas de órgão traqueal, permitindo a detecção mais rápida do VBI (BHATTACHARJEE et al., 1994).

O VBI também pode ser detectado diretamente em tecidos de aves infectadas por meio de técnicas de imunohistoquímica (IHC) ou por hibridização “in situ” (COLISSON et al., 1990; HANDBERG et al., 1999).

Os métodos sorológicos mais utilizados no diagnóstico da BIG são inibição de hemaglutinação (HI), vírus-neutralização (VN) (CAPUA, 1999) e o ELISA com anticorpos monoclonais ou policlonais. No entanto, em alguns casos são observados problemas relacionados ao desenvolvimento de reações inespecíficas, baixa sensibilidade, subjetividade da análise dos resultados, além da impossibilidade, no caso

das reações imunoenzimáticas, de discriminação entre as diferentes estirpes do VBI (IGNJATOVIC & ASHTON, 1996; WANG et al., 2002).

As técnicas de biologia molecular se constituem, por sua vez em um meio de diagnóstico rápido, preciso e específico na detecção do VBI. A reação em cadeia da polimerase (PCR) antecedida pela transcrição reversa (RT-PCR) provou ser muito útil na detecção de muitos RNA-vírus (CAVANAGH, 1993). O desenvolvimento da PCR trouxe ainda uma contribuição significativa para os trabalhos realizados dentro das pesquisas biotecnológicas, e o uso dessa técnica tornou-se muito popular no desenvolvimento de testes de diagnóstico.

A PCR constitui-se em uma técnica muito eficaz para produzir grandes quantidades de fragmentos amplificados de DNA a partir de uma pequena concentração de um DNA molde presente em uma amostra inicial. O processo utiliza uma DNA-polimerase termoestável (Taq polimerase) e oligonucleotídeos iniciadores específicos ("primers") que se ligam às extremidades 5' e 3' de uma determinada região do genoma a ser amplificada. A reação é baseada na incubação em vários ciclos constituídos essencialmente por 3 fases: (1-) desnaturação do DNA da amostra, (2-) anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores ao DNA desnaturado e (3-) extensão das cadeias de DNA a partir de cada um dos iniciadores e sob a catálise da enzima Taq DNA Polimerase, sendo que tais fases ocorrem em diferentes temperaturas (JACKWOOD, 1992).

No caso do VBI, por ser um RNA-vírus, a PCR foi aplicada pela primeira vez de forma bem sucedida depois que o genoma viral foi transformado, por meio da reação de transcrição reversa (RT), em cDNA (JACKWOOD et al., 1992).

Tradicionalmente, a técnica de vírus neutralização realizada em ovos embrionados foi utilizada para identificar os diferentes sorotipos do VBI. No entanto, hoje a técnica de RT-PCR pode ser rotineiramente utilizada com o objetivo de discriminar diferentes estirpes do VBI em genogrupos ou genótipos (KWON et al., 1993; JACKWOOD et al., 1997; KEELER et al., 1998). Além disso, deve ser destacado que um rápido teste de avaliação do polimorfismo gênico, que ocorre entre estirpes do VBI, pode ser feito sobre produtos do gene S amplificados previamente por meio da clivagem com algumas enzimas de restrição de tais produtos, processo esse que gera fragmentos de DNA de

diferentes tamanhos, de acordo com a presença ou a ausência de determinados sítios para cada uma das enzimas utilizadas, técnica conhecida como Polimorfismo de Tamanhos de Fragmentos Gerados por Digestão com Enzimas de Restrição (“Restriction Fragment Length Polymorphism”- RFLP) (KWON et al., 1993; JACKWOOD et al., 1997).

Na técnica convencional de PCR, para a detecção e análise dos fragmentos amplificados de DNA, é necessária a realização da separação eletroforética dos produtos amplificados na presença do corante brometo de etídeo, que é uma substância carcinogênica, seguindo-se da avaliação visual ou densitométrica das bandas resultantes após incidência de luz ultra-violeta. Em adição a isso, pode ser feita a detecção e a identificação do amplicom por Southern-blot, utilizando hibridização com sonda-oligonucleotídeo marcada, porém é um procedimento, via de regra, muito demorado e necessita de múltiplas manipulações do produto amplificado, aumentando o risco de dispersão desse mesmo produto dentro do próprio laboratório (MACKAY et al., 2002).

O advento do método de PCR em tempo real trouxe a possibilidade de se usar uma ferramenta de diagnóstico ainda mais rápida do que a técnica de PCR convencional, com uma vantagem, ainda, de promover um aumento na sensibilidade e reprodutibilidade. O emprego desta metodologia resulta, também, em uma redução no risco de contaminação do ambiente por manipulação de produtos amplificados, já que a PCR em tempo real permite a simultânea amplificação e detecção da seqüência gênica alvo amplificada, através do uso de marcadores fluorescentes, além de evitar manipulações adicionais na técnica de eletroforese e a exposição ao brometo de etídeo (MACKAY et al., 2002; NIESTERS, 2004).

A diferença básica entre a reação de PCR convencional e a em tempo real é que esta última ocorre em um sistema fechado e é monitorada através de um programa computacional que avalia a evolução da técnica por meio da detecção de fluorescência dos produtos amplificados a cada ciclo de amplificação (MACKAY et al., 2002).

O monitoramento da produção do amplicom em tempo real é possível através do uso de marcadores fluorescentes com afinidade específica para DNA de dupla cadeia,

ou de sondas específica de oligonucleotídeos marcadas com moléculas fluorescentes. O aumento da rapidez de diagnóstico é devido à não necessidade de utilização dos procedimentos de detecção realizados após a amplificação do produto, uma vez que são usados marcadores fluorescentes e em razão de ser um método sensível de detecção (GUT et al., 1999; LEUTENEGGER, 1999).

Atualmente, dois formatos de marcadores fluorescentes para a reação de PCR em tempo real têm sido mais empregados. O primeiro deles permite a detecção de seqüências específicas de nucleotídeos por meio de sondas de hibridização marcadas com fluorocromos, havendo diversos tipos desses tipos de sondas que variam consoante o fabricante e/ou aparelho para reação de PCR em tempo real (TaqMan, Molecular Beacons, LightCycler e Amplifluor). Todas essas sondas são baseadas na transferência de energia ressonante fluorescente (DEPREZ et al. 2002). O segundo formato de montagem e leitura da PCR em tempo real utiliza um marcador fluorescente que se liga à dupla fita de DNA, o SYBR Green I. Esse fluorocromo se liga a qualquer cadeia de dupla fita de DNA independentemente da seqüência de nucleotídeos. No presente estudo, foi dada preferência ao marcador SYBR Green I devido ao custo mais reduzido em relação aos demais reagentes análogos e, também, por tornar desnecessário a construção de sondas de hibridização para cada uma das estirpes de referência do VBI, já que essa metodologia com esse fluorocromo, pode permitir, em princípio, a diferenciação de estirpes através da análise de variações da temperatura de dissociação do produto amplificado ("Melting temperature" ou T_m) o qual é obtido através da utilização de um único par de oligonucleotídeos, como foi descrito para outros RNAvirus por CHUTINIMITKUL et al. (2005), PHAM et al. (2005) e VARGA & JAMES (2006).

ESCUTENAIRE et al. (2006) desenvolveram um método de RT-PCR em tempo real, realizado em um único passo, para a detecção dos principais gêneros de coronavírus, e com a utilização do marcador SYBR Green I, sendo que os principais resultados revelaram que essa metodologia foi capaz de detectar 32 coronavírus diferentes, incluindo-se aí o coronavírus canino, o coronavírus felino, o vírus da

gastroenterite transmissível dos porcos, o coronavírus bovino, o vírus da hepatite em camundongos e o vírus da bronquite infecciosa das galinhas.

TAN et al. (2004) comprovaram a alta sensibilidade e rapidez para a detecção do vírus da doença de Newcastle na técnica de RT-PCR em tempo real, tendo encontrado um limite de detecção de 10pg de DNA para a técnica de PCR em tempo real, enquanto que esses limites foram de 1 e 10ng para as técnicas RT-Nested-PCR-Elisa e de PCR convencional, respectivamente.

Diante de todas as informações acima relatadas e tendo em vista que não há estudos versando sobre a montagem e a padronização da técnica de RT-PCR em tempo com o fluorocromo SYBR GREEN I para fazer a detecção e a diferenciação de estirpes do VBI, foi então formulado o presente estudo com o propósito de desenvolver um método de PCR em tempo real para fazer a detecção e a diferenciação de estirpes do VBI presentes em amostras de tecidos e fluidos de aves experimentalmente infectadas, comparando-o com o desempenho das técnicas de RT-PCR convencional e da metodologia padrão para o diagnóstico laboratorial desse vírus, que é a técnica de isolamento viral em ovos embrionados de galinha.

3 OBJETIVOS

- Desenvolver os métodos de RT-PCR convencional e de RT-PCR em tempo real (rt RT-PCR) para fazer a detecção de estirpes do VBI em líquido cório alantóide (LCA) infectado e em amostras teciduais de aves infectadas experimentalmente, e avaliar a sensibilidade e especificidade analíticas.

- Avaliar a capacidade do método de PCR em tempo real diferenciar estirpes do VBI, através de análises da temperatura de dissociação (temperatura de “melting” ou T_m) das cadeias de DNA dos produtos amplificados nessa técnica.

- Determinar a cinética de detecção do VBI em amostras de traquéias e de pulmões de aves experimentalmente infectadas pelos métodos de RT-PCR convencional e em tempo real, bem como pela técnica de isolamento viral em ovos embrionados de galinha (IV).

- Comparar os resultados obtidos em cada um dos métodos de diagnóstico molecular empregadas nesse estudo, com aqueles observados na técnica padrão de diagnóstico (IV).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Vírus

Foram utilizadas as estirpes vacinais H120, H52 e Ma5 do VBI, provenientes de vacinas comerciais e fornecidas sob a forma liofilizada. Cada uma dessas estirpes vacinais foi diluída em 2,0 mL de água ultrapura e posteriormente inoculada em ovos embrionados SPF, a fim de se obter uma suspensão viral com um maior título infectante. Outras 14 estirpes do VBI foram empregadas neste estudo, incluindo-se seis estirpes de referência (M41, Connecticut, JMK, SE 17, Iowa 609 e Iowa 97) e oito isoladas de campo (VBISC01, VBIPR03, VBIPR02, VBIPR05, VBISP02, VBISC02, VBIPR06 e VBIPR07), todas elas obtidas no Centro Nacional de Pesquisa em Suínos e Aves da EMBRAPA (Concórdia –SC) (Tabela 1).

Para a avaliação da especificidade analítica das técnicas de biologia molecular utilizadas foram utilizados vírus aviários heterólogos e não relacionados ao VBI. Estes vírus foram provenientes de vacinas comerciais atenuadas e liofilizadas, foram o pneumovírus aviário (APV, Merial, EUA, grupo B), o vírus da doença de Newcastle (NDV, Merial, Brasil, estirpe LaSota) e o vírus da doença de Gumboro (GDV, Merial, Brasil, estirpe Lukert), sendo essas preparações processadas de forma análoga ao que foi descrito para a diluição das amostras vacinais do VBI.

4.2 Propagação viral em ovos embrionados

Esta técnica foi realizada com base na descrição de OWEN et al. (1991), com algumas alterações. Cada amostra teste do VBI foi inoculada em ovos embrionados SPF com 9 a 11 dias de incubação, sendo submetidas a três passagens sucessivas.

Foram utilizados 25 ovos por amostra, sendo 22 destinados à propagação viral e três ao controle da infecção. A inoculação foi feita na cavidade alantóide, administrando-se um volume de 200µL/ovo de suspensão de cada estirpe viral diluída a 1:100 em Meio de cultura Eagle (Gibco BRL, EUA) contendo antibióticos (200 UI/mL de Penicilina e 50 µg/mL de Estreptomicina) e antifúngico (50 UI/mL de Fungizone). Após 24 horas de incubação, os ovos foram avaliados, sendo considerada inespecífica a mortalidade ocorrida neste período, e, 36 horas pós-inoculação, os ovos remanescentes foram resfriados a 4°C e o LCA colhido e estocado a -70°C. A mortalidade embrionária dos três ovos controle foi avaliada diariamente, sendo os embriões mortos classificados como positivos ou negativos, respectivamente, de acordo com a presença ou ausência de lesões características do VBI (nanismo, enrolamento e/ou hemorragia) e mediante a comparação com os embriões do grupo controle negativo (dez ovos SPF inoculados apenas com Meio de cultura Eagle, o mesmo utilizado para diluição viral). Ao final do sétimo dia pós-inoculação, todos os ovos foram abertos e os embriões submetidos à mesma pesquisa de lesões características descritas anteriormente (nanismo e enrolamento).

Tabela 1. Estirpes virais do VBI utilizadas, classificação quanto ao sorotipo e número de acesso no GenBank .

	Estirpes	Sorotipos	Número de acesso^a
Referência	H120	Massachussets	M21970
	H52	Massachussets	AF352315
	Ma5	Massachussets	AY561713
	M41	Massachussets	M21883
	Connecticut	Connecticut	L18990
	JMK	JMK	L14070
	SE 17	SE 17	AF239984
	Iowa 609	Iowa	-
	Iowa 97	Iowa	-
Isolados de campo no Brasil	VBISC01	-	-
	VBIPR03	-	-
	VBIPR07	-	-
	VBISC02	-	-
	VBIPR05	-	-
	VBISP02	-	-
	VBIPR02	-	-
	VBIPR06	-	-

^a Número de acesso no Genbank das seqüências de nucleotídeos do gene S1 do VBI.

(-) Ausência de dados

4.3 Determinação da infectividade viral das estirpes M41 e H120

A infectividade viral foi determinada para cada estirpe do VBI através da titulação viral em ovos embrionados SPF com 9 a 11 dias de incubação. Partindo-se do LCA colhido de ovos infectados após a terceira passagem, foi determinado o número de Doses Infectantes Embrionárias 50% (DIE_{50%}) através do método de REED & MUENCH (1938). Para tanto, diluições de razão constante igual a dez e no intervalo entre 10^{-3} e 10^{-9} das estirpes M41 e H120 do VBI presentes em LCA foram preparadas em Meio Eagle (Gibco BRL, EUA) contendo antibióticos (200UI/mL de Penicilina e 50µg/mL de Estreptomicina) e antifúngico (50UI/mL de Fungizone) e inoculadas na cavidade alantóide, no volume de 200µL/ovo. Foram utilizados cinco ovos para cada diluição, além de dez ovos destinados ao controle (não infectados). A mortalidade foi observada durante todo o período de incubação, considerando-se morte inespecífica até 24 horas; ao final de sete dias, as alterações embrionárias dos sobreviventes foram analisadas.

4.4 Infecção experimental em aves

4.4.1 Infecção experimental em aves com a estirpe M41 do VBI

Foram utilizadas 45 aves de corte com um dia de idade não vacinadas contra a BIG, fornecidas pelo incubatório do Grupo Frango Sertanejo, Ipiguá - SP, as quais foram alojadas em isoladores com pressão positiva, com fornecimento de ar purificado por filtração absoluta, ração autoclavada e água filtrada.

Aos 28 dias de idade, três aves foram sacrificadas constituindo o grupo de controle negativo; as demais foram desafiadas inoculando-se 10^5 DIE₅₀/ave, via óculo-nasal (50µL via ocular e 50µL via nasal) de uma suspensão da estirpe M41 do VBI cujo título previamente definido era 10^6 DIE₅₀/mL.

Três aves foram sacrificadas em cada intervalo pós-infecção (p.i) a ser analisado, isto é, nos dias 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 17 e 20 p.i. Amostras de traquéia e

pulmão foram colhidas e armazenadas em Caldo Triptose Fosfato (TPB - Difco) acrescido de antibiótico (200UI/mL de Penicilina e 50µg/mL de Estreptomicina) e antifúngico (50UI/mL de Fungizone), a -20°C, até o momento de serem processadas nas técnicas de isolamento viral e extração de RNA genômico para aplicação nos métodos de RT-PCR convencional e RT-PCR em tempo real.

4.4.2 Infecção de aves com a estirpe vacinal H120 do VBI

Foram utilizadas 12 aves de corte de um dia de idade não vacinadas contra a BIG, fornecidas pelo incubatório do Grupo Frango Sertanejo, Ipiguá - SP, as quais foram alojadas em isoladores com pressão positiva e com fornecimento de ar purificado por filtração absoluta, ração autoclavada e água filtrada.

Aos 28 dias de idade, três aves foram sacrificadas, constituindo o grupo controle negativo; as demais foram inoculadas com vacina atenuada contendo a estirpe H120, por meio da inoculação de 50µL via ocular e 50µL via intranasal.

Três aves foram sacrificadas por intervalo, nos dias 3, 5 e 12 p.i. Amostras de traquéia e pulmão foram colhidas e armazenadas conforme descrito no item anterior.

4.5 Isolamento viral em ovos embrionados SPF

Esta técnica é considerada a padrão para diagnóstico do VBI e foi realizada com base na descrição de OWEN et al. (1991), com a introdução de algumas modificações. Em suma, as amostras de pulmão foram descongeladas, maceradas em “pools” de amostras provenientes de três aves e sendo correspondente a cada um dos intervalos pós-infecção estudados. Cada “pool” de amostras foi homogeneizado em suspensão a 20% (p/v) de Meio Eagle (Gibco BRL, EUA) acrescido de 10% de Caldo TPB (Difco), contendo antibióticos (Penicilina a 200UI/mL e Estreptomicina a 50µg/mL) e antifúngico (Fungizone a 50UI/mL). A suspensão tecidual foi então clarificada por centrifugação a

2000xg por cinco minutos, a 4°C, sendo o sobrenadante separado e armazenado a -70°C até o momento da inoculação em ovos embrionados SPF. Cada “pool” de amostras foi inoculado em ovos embrionados SPF com 9 a 11 dias de incubação, tendo sido utilizados cinco ovos para cada pool. A inoculação foi feita na cavidade alantóide, administrando-se um volume de 100µL/ovo, e decorridas 24 horas, os ovos foram avaliados, sendo a mortalidade ocorrida nesse período considerada inespecífica. No intervalo de 36 horas pós-inoculação, dois ovos por amostra foram retirados da incubadora e colocados sob refrigeração a 4°C, e o LCA foi colhido e estocado a -70°C para ser utilizado em uma segunda passagem em ovos embrionados. A mortalidade dos demais ovos foi avaliada diariamente até completar sete dias da inoculação, os embriões mortos foram classificados como positivos ou negativos, conforme a presença ou a ausência de lesões características do VBI no embrião de galinha (nanismo e enrolamento), mediante a comparação com os embriões do grupo controle (sem infecção). Ao final do sétimo dia, todos os ovos foram abertos e os embriões submetidos à mesma pesquisa de lesões características relatadas anteriormente, sendo realizadas mais duas passagens nas mesmas condições descritas acima.

As amostras de traquéia foram descongeladas e processadas em “pools” de três aves e de forma similar às amostras de pulmão; no entanto, não foram maceradas, mas sim os fragmentos de traquéia com cerca de 1,0cm de comprimento de cada uma das aves infectadas experimentalmente foram seccionados longitudinalmente, tendo sido feitos raspados da superfície mucosa interna desses fragmentos traqueais com o auxílio de lâminas de bisturi. Esses raspados da mucosa traqueal foram ressuspensos na razão de 20% em meio Eagle acrescido de TPB, antibióticos e antifúngico para depois serem inoculados na cavidade cório-alantóide de ovos embrionados de galinha com 9 a 11 dias de incubação. A partir daí, foram seguidos os mesmos procedimentos descritos anteriormente para o processamento das amostras de pulmão.

Em relação ao grupo de aves infectadas com a estirpe H120 do VBI, as amostras de pulmão e de traquéia foram reunidas em um “pool” para cada intervalo de colheita, diferentemente das amostras provenientes de aves infectadas experimentalmente com

a estirpe M41, onde, para cada intervalo pós-infecção, havia um “pool” de amostras de traquéia e outro de amostras de pulmão.

4.6 Extração de RNA genômico

A extração de RNA foi realizada com o uso do kit Trizol LS Reagent (Invitrogen) nas amostras de LCA obtidas no item 4.2, e Trizol Reagent, para as amostras teciduais, conforme as especificações do fabricante, com algumas modificações.

Em resumo, as amostras teciduais de pulmões e de traquéia provenientes das aves infectadas experimentalmente (0,1g - 0,2g) foram maceradas juntamente com 1000 μ L de Trizol Reagent, utilizando-se um micropistilo em um microtubo. No caso da traquéia foi feito um raspado da superfície mucosa interna com auxílio de lâmina de bisturi. Para as amostras de LCA, a proporção 1:1 (Trizol LS Reagent : LCA) foi estabelecida, ou seja, cerca de 500 μ L de Trizol LS Reagent foram adicionados a 500 μ L de LCA. A mistura foi homogeneizada por 15 segundos no vórtex e incubada por cinco minutos à temperatura ambiente (TA). Acrescentou-se 200 μ L de uma mistura de clorofórmio e álcool isoamílico (na proporção de 24:1), realizando-se agitação por inversão. Após um período de três minutos à TA, as amostras foram centrifugadas a 12000xg durante 15 minutos a 4°C; aproximadamente 500 μ L do sobrenadante foram separados e transferidos para outro microtubo (1,5mL). As amostras de RNA foram precipitadas em 500 μ L de isopropanol, após incubação por dez minutos, a TA, e centrifugação 12000xg, por dez minutos a 4°C. O isopropanol foi descartado e as amostras foram lavadas em 1000 μ L de etanol (75%) e secas à TA. Em seguida, os precipitados foram ressuspensos em 15 μ L de água tratada com Dietil - pirocarbonate 0,1% (DEPC) para utilização na reação de transcrição reversa (RT).

4.7 “Primers”

O gene S1 foi escolhido como alvo deste estudo devido à grande hipervariabilidade gênica existente, o que, em tese, possibilita variações da T_m (temperatura de “Melting” ou de dissociação) obtida na dissociação realizada após a PCR em tempo real, a qual, em princípio, depende da porcentagem das bases citosina (C) e guanina (G) encontradas em nessas regiões hipervariáveis de cada estirpe, ou da ocorrência de seqüências de inserção ou deleção nessas mesmas regiões gênicas.

Foram utilizados dois pares de “primers” ou oligonucleotídeos iniciadores (Tabela 2), localizados na subunidade S1 do gene S do VBI. O primeiro par (W+/W-) está descrito no trabalho de WANG et al. (1996) e foi utilizado com o objetivo de avaliar alterações na seqüência gênica da região de hipervariabilidade gênica 1 (HRV1). Quanto ao segundo par de “primers” (HV+/HV-), os mesmos foram desenhados com base em alinhamentos realizados no programa computacional CLUSTAL W, de seqüências de nucleotídeos do gene S1 encontradas no GenBank, as quais estão localizadas na região de hipervariabilidade gênica 2 (HRV2) (Figura 1) e com auxílio do programa GeneRunner (versão 3.05).

Tabela 2. Nomenclatura, localização e procedência dos “primers” utilizados neste estudo e respectivos fragmentos amplificados.

Nome	Localização^b	Referência	Fragmento amplificado
W+	20487-20506	Wang et al. (1996)	216 - 228 pb
W- ^a	20698-20714	Wang et al. (1996)	
HV+	20704-20720	Desenhado	191 – 212 pb
HV-	20878-20894	Desenhado	

+ = “Forward”

- = “Reverse”

^a Modificado

^b Localização dos “primers” com base na seqüência gênica da estirpe M41 do VBI cadastrada no GenBank (número de acesso: AY851295)

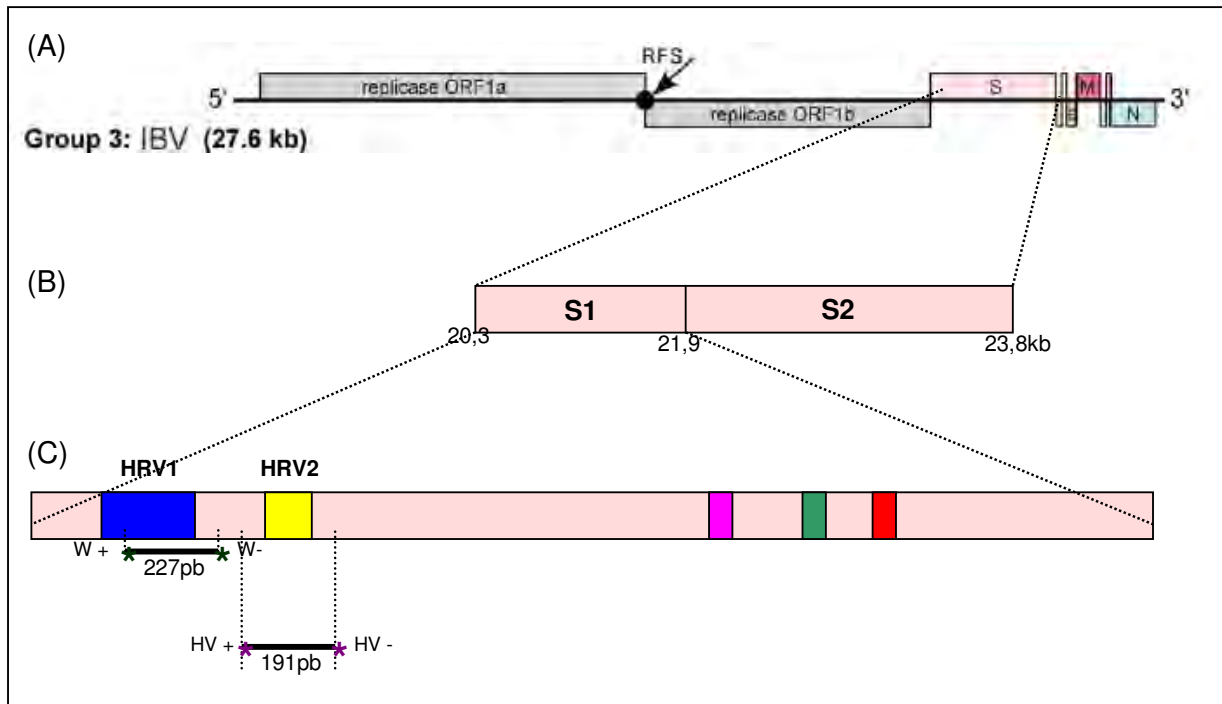


Figura 1. Representações esquemáticas: (A) Genoma do VBI – GORBALENYA et al. 2006, (B) Gene S e subunidades S1 e S2 e (C) Regiões de hipervariabilidade gênica 1 e 2 (HRV1 e HRV2) localizadas no gene S1, com respectivas combinações de “primers”.

4.8 Reação de transcrição reversa (RT)

A reação de transcrição reversa foi feita em um Termociclador PTC – 200 Peltier Thermal Cycler (MJ Research, U.S.A) incubando-se a 25°C durante dez minutos: 5µL do RNA genômico extraído, dNTP 0,5mM (Invitrogen), 3µg de Random Primer (Invitrogen) e 7µL de água DEPC. Em seguida, acrescentou-se o tampão da RT 5x (Invitrogen) 1µL de RNAGuard (GE) e incubou-se a 42°C durante dois minutos; após adição de 50U da enzima SuperScript (Invitrogen), incubou-se a 42°C durante 60 minutos, e a 70°C por 15 minutos. O volume final da reação foi de 20µL, o qual foi armazenado a –20°C para uso posterior nas técnicas de PCR convencional e PCR em tempo real.

4.9 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) convencional

As técnicas de PCR foram realizadas em um Termociclador PTC – 200 Peltier Thermal Cycler (MJ Research, U.S.A) com a adição de 2,5µl de cDNA obtido na técnica de RT, tampão da PCR 10x (Invitrogen) , dNTP 0,2mM (Invitrogen), 10pmol de cada “primer”, cloreto de magnésio 1,5mM e 1,0U Taq DNA polimerase (Invitrogen), completando-se com água para um volume final de 25µl. A reação incluiu: um ciclo inicial de 95°C por oito minutos; 40 ciclos (desnaturação de 95°C por um minuto, anelamento de 45°C por um minuto e extensão de 72°C por um minuto); e ciclo único de 72°C por dez minutos, para extensão final.

4.10 Eletroforese em gel de agarose

Após as reações de PCR, foram adicionados 2µL de tampão amostra [0,05% (p/v) de azul de bromofenol; 40% de sacarose (p/v); Tris-HCl 10mM e pH 7,8; EDTA 1M e pH 8,0] em 5µL de produto amplificado, o qual foi analisado através de eletroforese horizontal no sistema , em tensão de 100V por aproximadamente uma hora, em gel de agarose 1% contendo tampão TEB 0,5X (Tris 0,045M, ácido bórico 0,045M e EDTA 0,001M, pH 8,0) e brometo de etídio (0,5µg/µL). Como padrão de peso molecular foi utilizado o marcador “100bp DNA Ladder” (Invitrogen) ou o marcador “1kb plus” (Invitrogen) para eletroforese dos produtos de PCR. Os géis foram visualizados através de incidência de luz ultravioleta em um transiluminador (Syngene) e fotodocumentados com uma câmera digital (Synoptics) e processados por meio do software Gene Link (Syngene).

4.11 PCR em tempo real

Após a extração do RNA feita com a utilização do kit Trizol (Gibco BRL, EUA) e o preparo de cDNA na técnica de RT com os procedimentos descritos anteriormente, o método de PCR em tempo real foi realizado, utilizando o marcador SYBR Green I (Invitrogen), sendo a reação conduzida em um aparelho termociclador configurado para essa metodologia (Applied Biosystems – Modelo Real time - 7500). Foi utilizado um volume de 2,5µL de cDNA proveniente da RT, ao qual acrescentou-se 12,5µL da mistura Taq platinum – SYBR Green (Invitrogen), 10pmol de cada “primer”, completando-se com água para um volume final de 25µL. As reações foram realizadas em microtubos especiais de 0,2mL com as tampas apropriadas para leitura óptica, o que é requerido pelo sistema de detecção e mensuração fotométrica desse equipamento de PCR em tempo real (ABI PRISM - Applied Biosystems, U.S.A). Os ciclos da reação foram constituídos por um primeiro ciclo de 95°C por oito minutos, seguindo-se de mais 40 ciclos compostos por desnaturação a 95°C por um minuto, anelamento a 45°C por 1 minuto e extensão a 72°C por um minuto. Ao final dessa etapa de 40 ciclos, foi realizada a dissociação dos produtos amplificados de DNA, entre a temperatura de 65°C e 95°C, para a avaliação da T_m, e as leituras efetuadas a cada 0,1°C. Todas as amostras foram testadas, no mínimo, em duplicata.

O valor C(T) (“Threshold cycle”) foi estabelecido neste estudo como o número de ciclos necessários para que a amostra analisada atinja a fluorescência de 0,05.

Todas as amostras que apresentaram aumento exponencial da curva de amplificação durante a PCR em tempo real e também um valor específico de T_m, foram consideradas positivas, tal como foi descrito por ESCUTENAIRE et al. (2006). Foram, também, realizados testes preliminares sem a adição da referência passiva Rox, sendo, contudo, obtidos resultados insatisfatórios (dados não apresentados), o que deixou patente a importância de se utilizar esse reagente.

4.12 Determinação da especificidade analítica

A especificidade analítica foi avaliada testando-se três outros RNA-vírus aviários que foram obtidos a partir de amostras virais provenientes de vacinas “vivas” atenuadas, como o pneumovírus aviário (APV, Merial, EUA, grupo B), o vírus da doença de Newcastle (NDV, Merial, Brasil, estirpe LaSota) e o vírus da doença de Gumboro (GDV, Merial, Brasil, estirpe Lukert), na RT-PCR convencional e também na rt RT-PCR.

4.13 Determinação da sensibilidade analítica

4.13.1 Determinação da sensibilidade analítica a partir da diluição do LCA

A determinação da sensibilidade analítica foi realizada nas reações de RT-PCR convencional e RT-PCR em tempo real.

Foram avaliadas diferentes diluições do LCA infectado com a estirpe M41 do VBI utilizado na extração de RNA. Para tanto, o LCA foi submetido a diluições seriadas de razão constante igual a 10 (10^{-1} a 10^{-10}), as quais foram a seguir processadas pelas técnicas de extração de RNA, seguida da RT-PCR ou rt RT-PCR.

4.13.2 Determinação da sensibilidade analítica a partir da diluição do cDNA

A determinação da sensibilidade analítica foi realizada nas reações de RT-PCR convencional e RT-PCR em tempo real.

Foram avaliadas diferentes diluições do cDNA obtido após a transcrição reversa do RNA extraído do LCA infectado com a estirpe M41 do VBI. Para tanto, o cDNA foi submetido a diluições seriadas de razão constante igual a 10 (10^{-1} a 10^{-10}), as quais foram a seguir processadas pelas duas técnicas.

4.13.3 Determinação da sensibilidade analítica a partir da diluição de DNA plasmideal e construção da curva padrão

A curva padrão foi construída para quantificação relativa do cDNA. Um fragmento de cerca de 1,6Kb do gene S1 da estirpe M41 do VBI foi clonado no vetor PYES 2.1/v5 – His TOPO (Invitrogen). O DNA plasmideal foi extraído, quantificado através da leitura em biofotômetro (Eppendorf) e submetido a diluições seriadas de razão constante igual a 10 (10^{-1} a 10^{-10}), e em seguida às técnicas de RT-PCR convencional e em tempo-real.

Os valores obtidos a partir da quantificação do DNA plasmideal foram convertidos em número de moles utilizando-se o programa computacional Molbio.ru (www.molgen.mpg.de/~soldatov/protocols/scripts/01_07.html).

Os valores de CT obtidos a partir da RT-PCR em tempo real foram subsequentemente usados para calcular e traçar uma linha de regressão linear através do logaritmo do número de moles do “template” (eixo Y) contra o valor correspondente de CT (eixo X).

4.14 Alinhamento de seqüências do VBI cadastradas no Genbank para relacionar dados de Tm com as seqüências de nucleotídeos das regiões gênicas de S1 testadas

Foram realizados alinhamentos das regiões gênicas HRV1 e HRV2 do gene S1 de estirpes de referência do VBI utilizadas neste estudo (M41, H120, H52, Ma5, Connecticut, JMK e SE 17) e algumas isoladas de campo no Brasil (USP01, USP02, USP03, USP04, USP05, USP06, USP07, USP08, USP09, USP10, USP11, USP12) seqüenciadas por VILLARREAL et al. (2006) na Universidade de São Paulo, e que se encontram cadastradas no Genbank, através do uso do programa computacional Gene Runner (versão 3.05), para separação das regiões gênicas relativas às seqüências dos fragmentos amplificados pelas rt RT-PCRs com os “primers” W+/W- e HV+/HV-; em

seguida as regiões gênicas selecionadas foram alinhadas através do programa computacional BioEdit Sequence Alignment Editor (versão 5.0.9) e Clustal W.

4.15 Análise Estatística

4.15.1 Diferenciação entre estirpes do VBI pelas análises da temperatura de dissociação

Para a diferenciação entre estirpes do VBI testadas, os valores de T_m obtidos a partir da dissociação dos produtos do gene S1, realizada após a rt RT-PCR, foram analisados estatisticamente pelo método de Scott Knott (1974) com 5% de significância. Ao final desta análise, as amostras foram agrupadas quanto à similaridade das temperaturas de dissociação obtidas para cada região gênica amplificada.

4.15.2 Comparação dos índices de detecção obtidos a partir dos testes de biologia molecular e do teste padrão de isolamento viral

Para a avaliação da performance dos métodos de RT-PCR e rt RT-PCR frente à técnica padrão de IV em ovos embrionados SPF, a co-positividade e a co-negatividade foram calculadas a partir dos resultados obtidos no processamento das amostras teste, com conseqüente determinação da sensibilidade e especificidade, conforme realizado por BRONZONI (1999). Foram realizados três tipos de avaliação, a primeira relativa à detecção em amostras teciduais (de pulmão e de traquéia) das aves experimentalmente infectadas com a estirpe M41 do VBI, frente às técnicas de biologia molecular e de IV, a segunda avaliação foi realizada a partir de todas as amostras processadas durante este experimento (aves vacinadas e aves infectadas); em adição, o método Kappa de estatística foi calculado para a análise de concordância desses mesmos métodos com a técnica de IV.

5 RESULTADOS

5.1 Detecção de diferentes estirpes do VBI pela técnica de RT-PCR convencional

Todas as 17 estirpes do VBI testadas (H120, H52, Ma5, M41, Connecticut, JMK, Iowa 609, Iowa 97, SE17, VBIPR07, VBIPR03, VBIPR02, VBIPR05, VBISP02, VBISC02, VBIPR06 e VBIPR07) foram amplificadas com a utilização de ambos pares de oligonucleotídeos iniciadores empregados nesse estudo (W+/W- e HV+/HV-), gerando produtos amplificados de cerca de 228 e 191 pb, respectivamente (Figura 2).

No entanto, para fins de detecção do vírus, o par de oligonucleotídeos iniciadores que foi selecionado para ser utilizado na detecção inicial do VBI foi o HV+/HV-, devido ao seu melhor desempenho na rt RT-PCR, o que ficará demonstrado e melhor explanado nos itens subseqüentes.

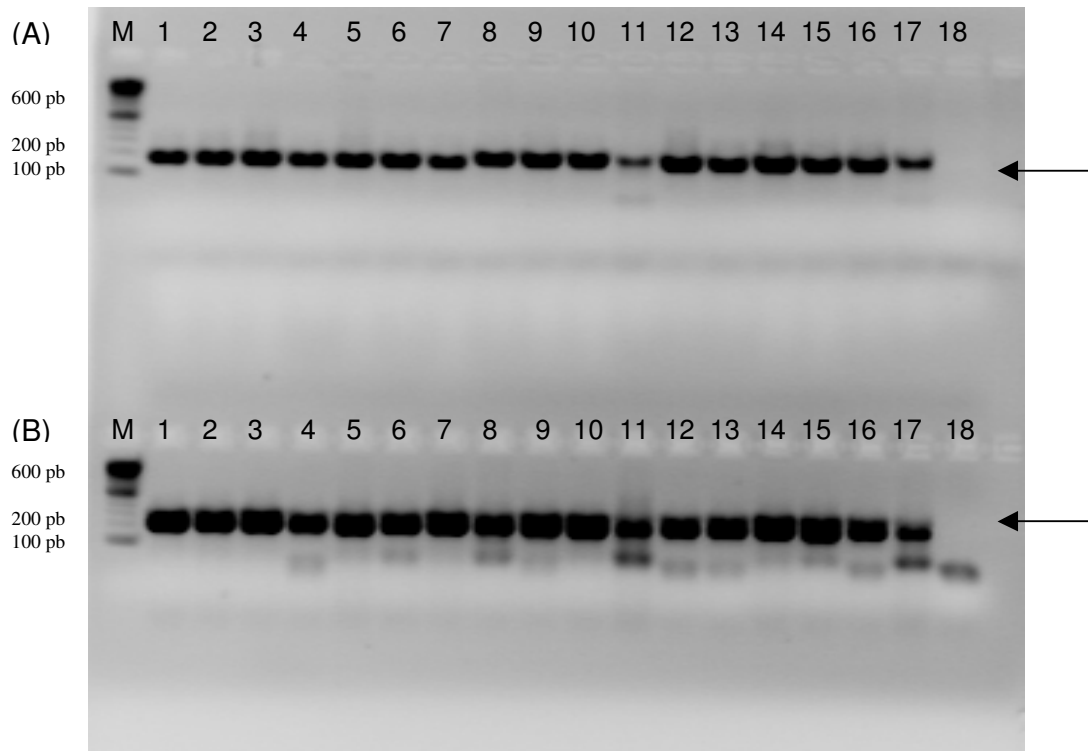


Figura 2. Detecção de diferentes estirpes do VBI testadas pela técnica de RT-PCR convencional. (A) Uso da combinação de “primers” HV+/HV-. (B) Uso da combinação de “primers” W+/W-. Legenda: M- Marcador 100 bp Ladder, 1-M41, 2-H120, 3-H52, 4-Ma5, 5-Connecticut, 6-Iowa 97, 7-Iowa 609, 8-JMK, 9-SE 17, 10-VBIPR02, 11-VBIPR06, 12-VBIPR07, 13-VBIPR03, 14-VBISC01, 15-VBIPR05, 16-VBISP02, 17-VBISC02, 18-Controle negativo.

5.2 Detecção e diferenciação de estirpes do VBI pela da técnica de RT-PCR em tempo real e análises das curvas de dissociação

Foram realizados testes preliminares para a detecção das 17 diferentes estirpes do VBI em estudo, por meio da técnica de PCR em tempo real e com a utilização de ambas combinações de “primers” W+/W- e HV+/HV-. Para otimização dessas reações foi necessária a realização de vários testes com diferentes concentrações de “primers”, de cloreto de magnésio, da Taq DNA Polimerase, de cDNA (template), além de diferentes temperaturas de anelamento (dados não apresentados).

A combinação de “primers” W+/W- levou à amplificação de dímeros de “primers” somente em amostras negativas para VBI, no entanto tais produtos inespecíficos foram facilmente diferenciados devido à baixa T_m apresentada e ao deslocamento do pico de dissociação à esquerda (Figura 5). Já a reação de RT-PCR em tempo real realizada com a utilização do par de oligonucleotídeos iniciadores HV+/HV- não apresentou nenhuma amplificação inespecífica (Figura 10).

Os valores de T_m considerados específicos ficaram compreendidos nos intervalos de 80°C a 84°C e de 74°C a 78,5°C para as rt RT-PCRs realizadas, respectivamente, com os pares de “primers” W+/W- e HV+/HV-.

A adição de DTT (“dithiothreitol”) durante a reação de transcrição reversa, prática essa comumente utilizada com intuito de proteger as pontes dissulfeto da oxidação e que tem o seu uso geralmente recomendado para a estabilização das reações enzimáticas, não foi empregada no protocolo da RT adotado, pois verificou-se que esse reagente interfere negativamente na reação de PCR em tempo real. Quando na presença desta substância, o valor $C(T)$ aumentou significativamente de 13,57 ($\pm 0,03$) para 15,30 ($\pm 0,01$), como pode ser observado na Tabela 3 e Figura 3, onde foram testadas duas reações de RT-PCR em tempo real, uma com a adição de 0,1M DTT durante a reação de RT, e outra, sem a adição desse reagente.

Deve-se esclarecer, ainda, que os valores de T_m obtidos foram expressos sob a forma de médias e desvios padrão, sendo que todos os testes foram realizados no mínimo em duplicata.

Tabela 3. Valores médios e respectivos desvios padrão de fluorescência e C(T) obtidos a partir da PCR em tempo real com amostras processadas com ou sem a adição de DTT durante a RT.

	Fluorescência	C(T)
Presença de DTT	0,17 (\pm 0,04)	15,30 (\pm 0,01)
Ausência de DTT	0,17 (\pm 0,14)	13,57 (\pm 0,04)

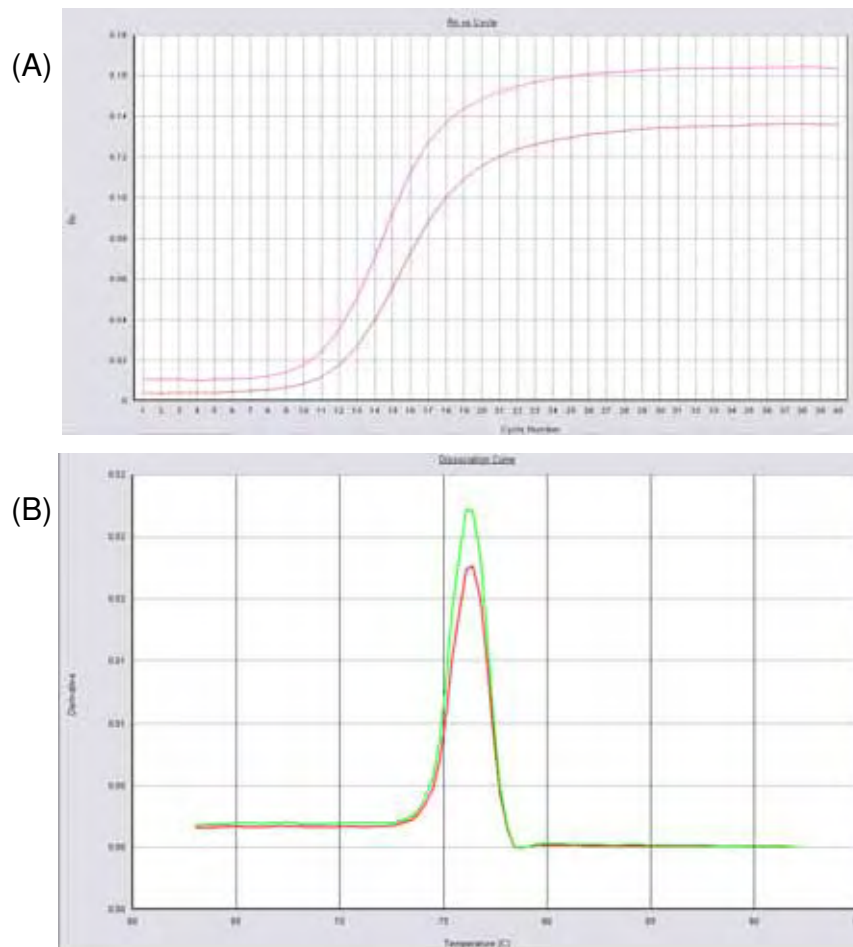


Figura 3. Resultados obtidos a partir do teste da influência do DTT na rt RT-PCR com uso dos “primers” HV+ / HV-. (A) Curvas de amplificação. Legenda: Linha rosa - Amostra de M41 sem a adição de DTT durante a reação de RT. Linha vermelha - Amostra de M41 com a adição de 0,1 M DTT durante a reação de RT. (B) Curvas de dissociação. Legenda: Linha verde - Amostra de M41 sem a adição de DTT durante a reação de RT. Linha vermelha - Amostra de M41 com a adição de 0,1 M DTT durante a reação de RT.

Os valores de T_m obtidos a partir da dissociação dos produtos amplificados gerados a partir das rt RT-PCRs com a combinação de “primers” W+/W- e os gráficos correspondentes encontram-se na Tabela 4 e Figuras 4 a 8, respectivamente.

A estirpe Connecticut do VBI apresentou menor T_m quando foi analisado o produto amplificado com o par de “primers” W+/W- ($80,70 \pm 0,10$) (Figura 6). Já, a estirpe VBIPR05 apresentou dois picos de T_m em relação ao produto amplificado pelos “primers” W+/W- (Figura 8); um pico correspondente à temperatura de aproximadamente $80,25^\circ\text{C}$ e outro à temperatura aproximada de $83,10^\circ\text{C}$.

Os valores de T_m obtidos a partir da dissociação dos produtos amplificados gerados na técnica de rt RT-PCR com a combinação de “primers” HV+/HV- e os respectivos gráficos encontram-se na Tabela 5 e Figuras 9 a 13.

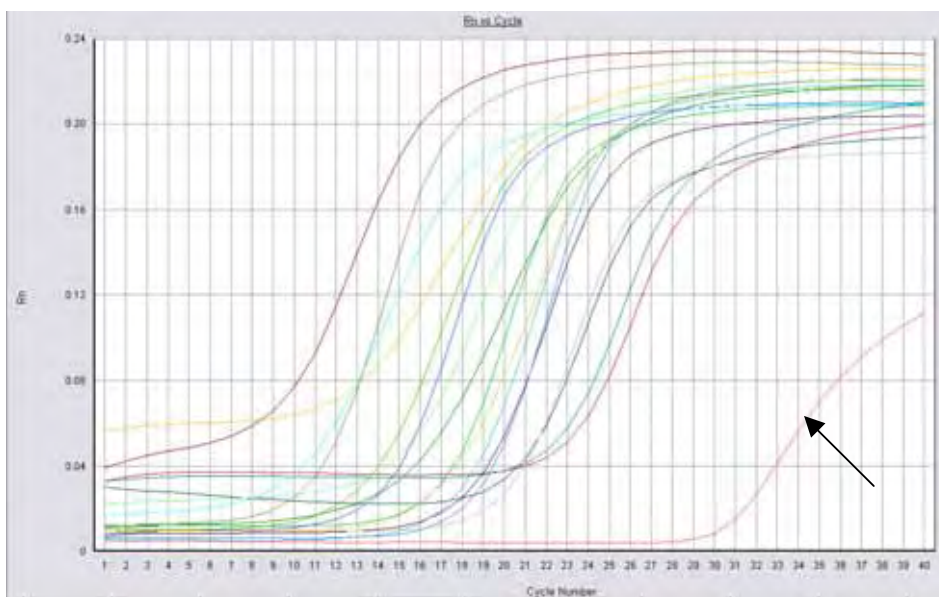


Figura 4. Curvas de amplificação obtidas na PCR em tempo real com uso dos “primers” W+/W-, relativas às diferentes estirpes do VBI testadas. Pode ser observada a amplificação “tardia” de dímeros de “primer” (indicada pela seta).

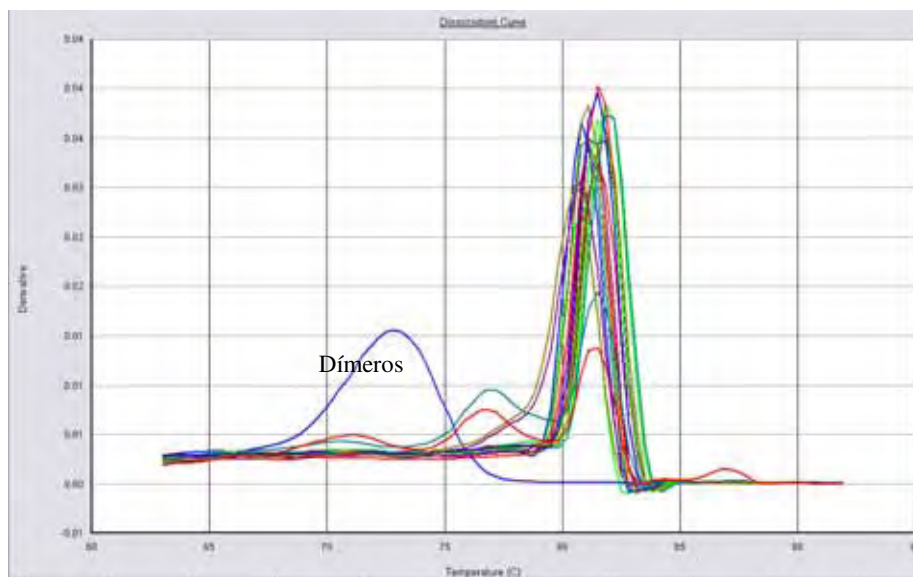


Figura 5. Curvas de dissociação obtidas na PCR em tempo real com a utilização dos “primers” W+/W-, relativas às diferentes estirpes do VBI testadas. Foi observada a presença de dímeros de “primers” (pico à esquerda em azul).

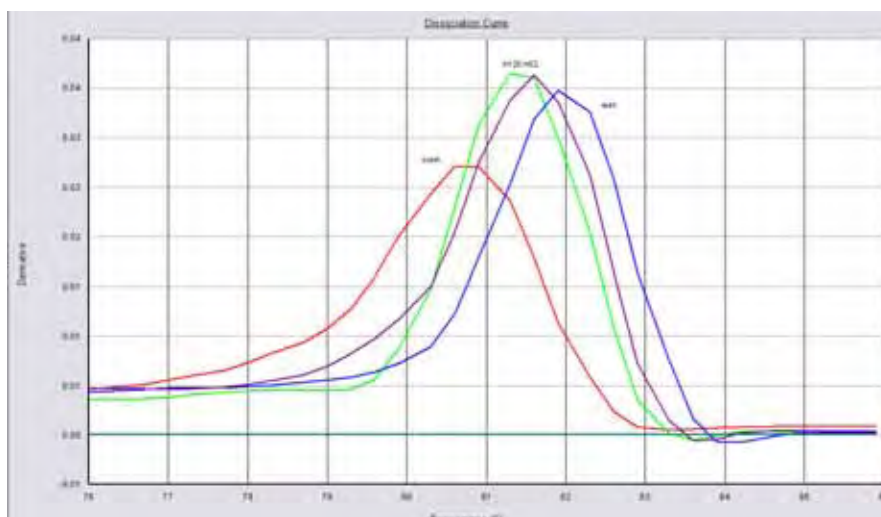


Figura 6. Curvas de dissociação obtidas na PCR em tempo real com uso dos “primers” W+/W-, relativas a quatro estirpes de referência do VBI testadas. Pode ser observado o deslocamento do pico de dissociação à esquerda da estirpe Connecticut (linha vermelha), a sobreposição dos picos das estirpes vacinais H120 e H52 (linhas verde e roxa, respectivamente), e o deslocamento do pico da estirpe M41 ligeiramente à direita (linha azul).

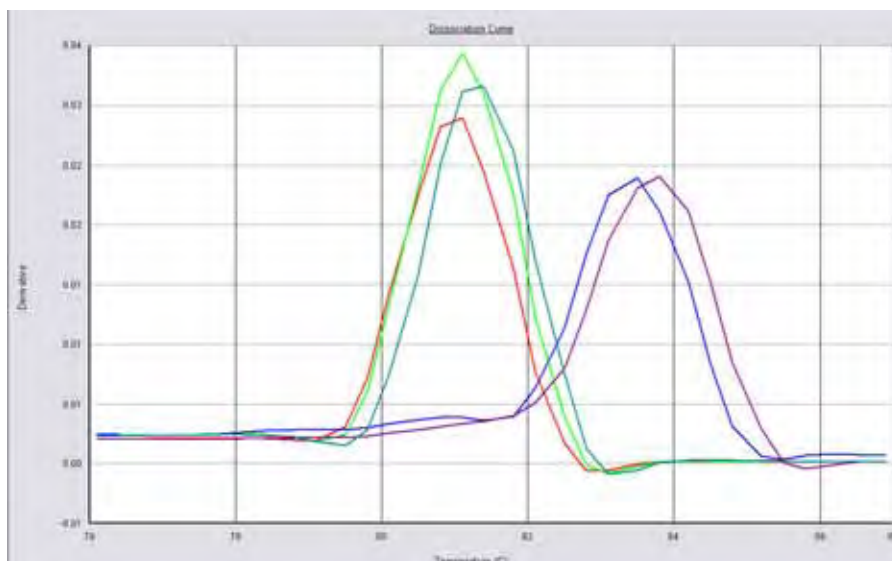


Figura 7. Curva de dissociação da reação de PCR em tempo real com a utilização dos “primers” W+ / W-, com as diferentes estirpes do VBI testadas. Pode ser observado o deslocamento dos picos de dissociação das estirpes JMK e SE 17 à direita (linhas azul e roxa, respectivamente), e, à esquerda estão localizados os picos de dissociação das estirpes Ma5, Iowa 97 e M41 (linhas vermelha, verde e verde escuro, respectivamente)

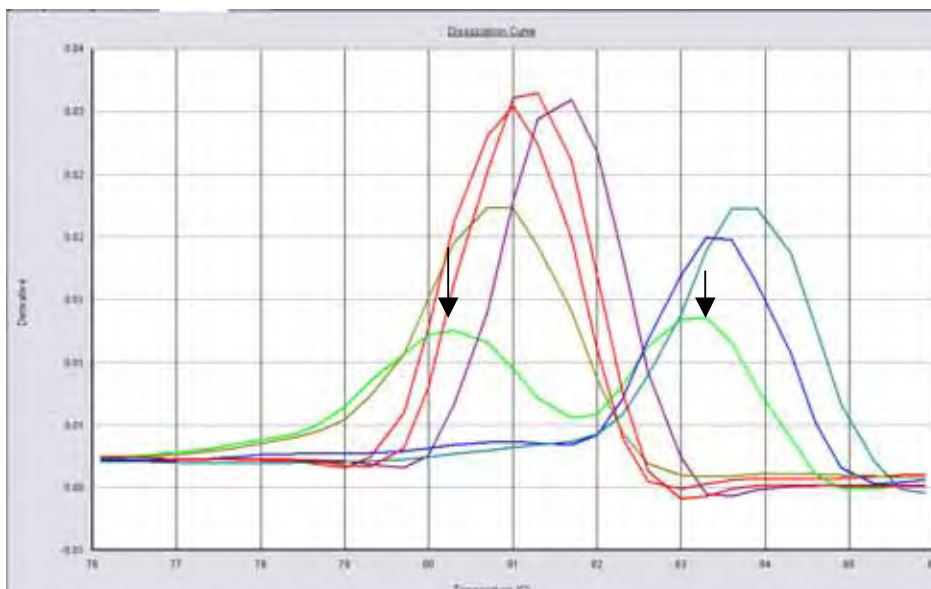


Figura 8. Curvas de dissociação obtidas na PCR em tempo real com uso dos “primers” W+/W-, relativas às diferentes estirpes do VBI testadas. Pode ser observada a presença de dois picos de dissociação da estirpe VBIPR05, indicados pelas setas.

Tabela 4. Valores de T_m obtidos a partir da RT-PCR em tempo real com uso dos “primers” W+/W-, e relação com a porcentagem de Citosina + Guanina (CG) e tamanho esperado dos fragmentos amplificados em pares de bases (pb) com base em seqüências gênicas que se encontram cadastradas no GenBank.

Estirpes	Sorotipos	T_m^a	%CG	Pb
M41	Massachussets	81,77 (± 0,12)	42,50	228
H120	Massachussets	81,77 (± 0,06)	41,20	228
H52	Massachussets	81,33 (± 0,06)	41,20	228
Ma5	Massachussets	81,30 (± 0,43)	41,20	228
Connecticut	Connecticut	80,70 (± 0,10)	39,40	216
JMK	JMK	83,40 (± 0,10)	41,70	228
SE 17	SE 17	83,70 (± 0,10)	41,20	228
Iowa 609	Iowa	81,47 (± 0,41)	-	-
Iowa 97	Iowa	81,27 (± 0,15)	-	-
VBIPR02	-	80,30 (±0,34)	-	-
VBIPR03	-	81,33 (± 0,30)	-	-
VBIPR07	-	81,33 (± 0,28)	-	-
VBIPR05	-	83,17 (± 0,12)	-	-
VBISP02	-	81,40 (± 0,56)	-	-
VBISC02	-	80,60 (± 0,14)	-	-
VBISC01	-	81,17 (± 0,20)	-	-
VBIPR06	-	80,40 (±0,42)	-	-

^a Temperatura de dissociação (T_m) média e desvio padrão

(-) Ausência de dados

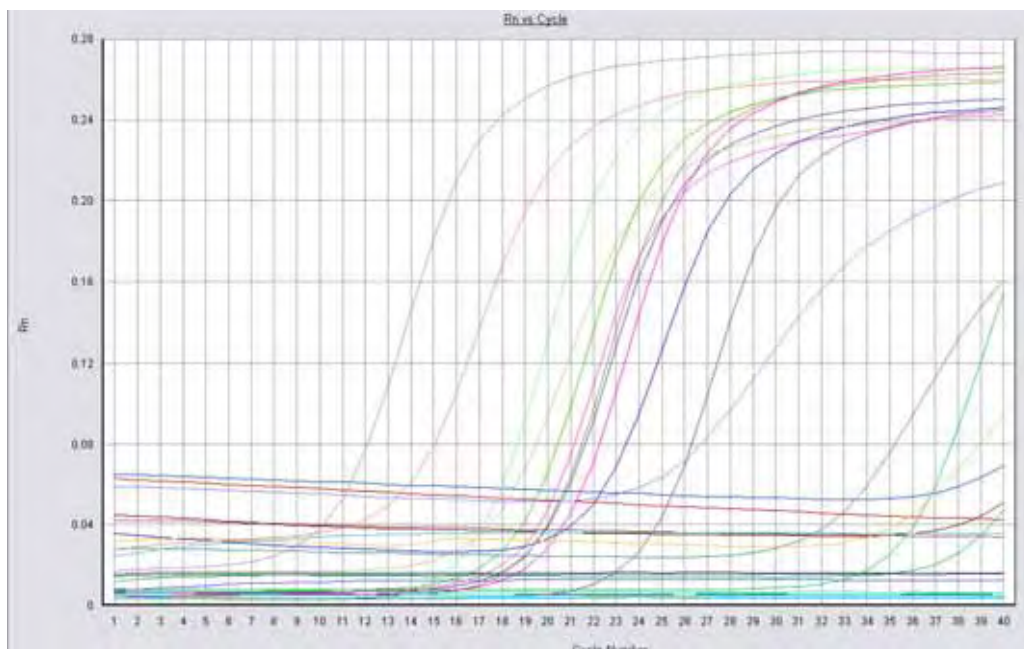


Figura 9. Curvas de amplificação da PCR em tempo real com uso dos “primers” HV+/HV-, relativas às diferentes estirpes do VBI testadas.

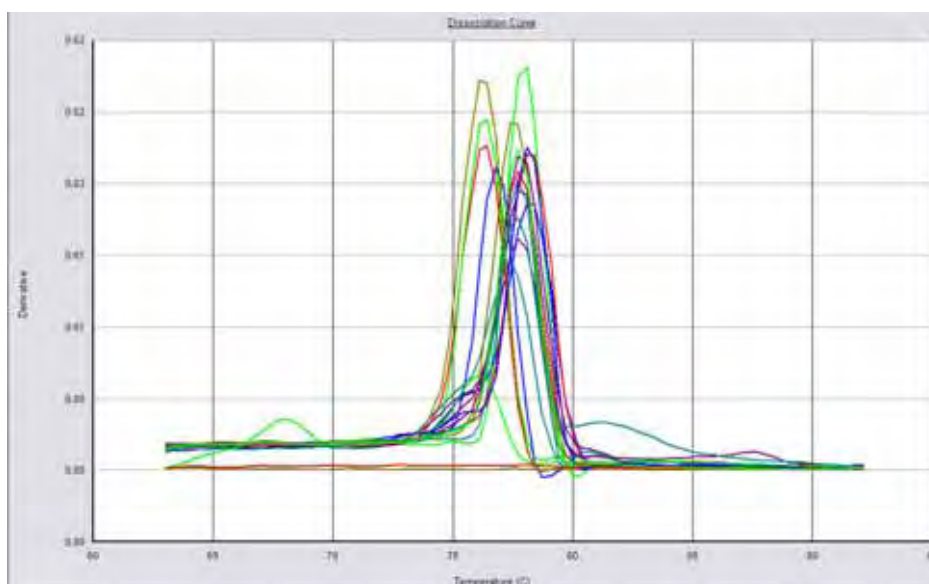


Figura 10. Curvas de dissociação da PCR em tempo real com uso dos “primers” HV+/HV-, relativas às diferentes estirpes do VBI testadas.

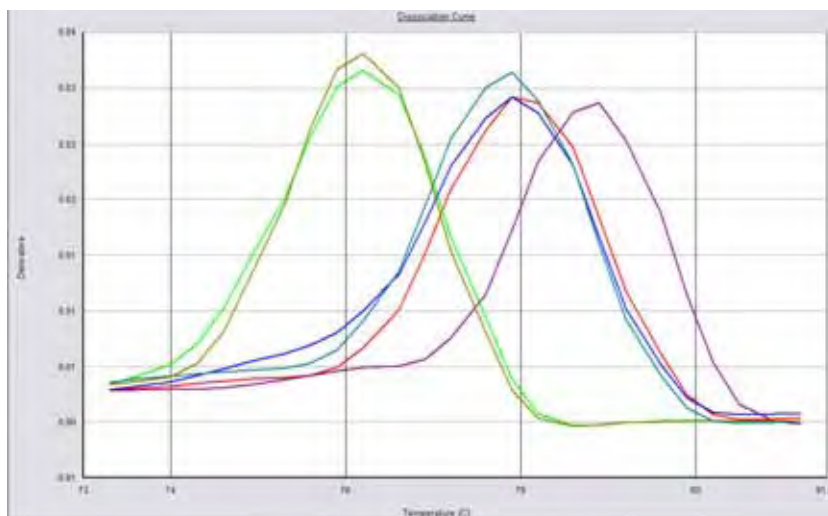


Figura 11. Curvas de dissociação da PCR em tempo real com uso dos “primers” HV+/HV-, relativas a seis estirpes do VBI testadas. Pode ser observado o deslocamento à esquerda (linhas verde e amarela) dos picos de dissociação das estirpes M41 e Iowa 609, picos intermediários correspondentes às estirpes vacinais Ma5, H52 e H120, e, à direita, o pico da estirpe SE 17 (linha roxa).

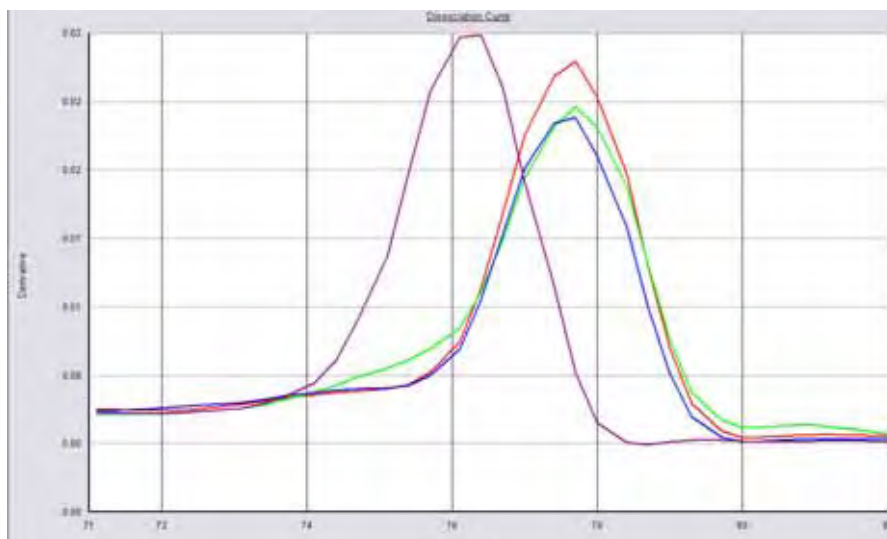


Figura 12. Curvas de dissociação da PCR em tempo real com uso dos “primers” HV+/ HV-, relativas às estirpes do sorotipo Massachussets. Pico à esquerda (linha roxa) da estirpe M41, e três picos à direita relacionados às estirpes vacinais Ma5, H52 e H120 (linhas vermelha, azul e verde, respectivamente).

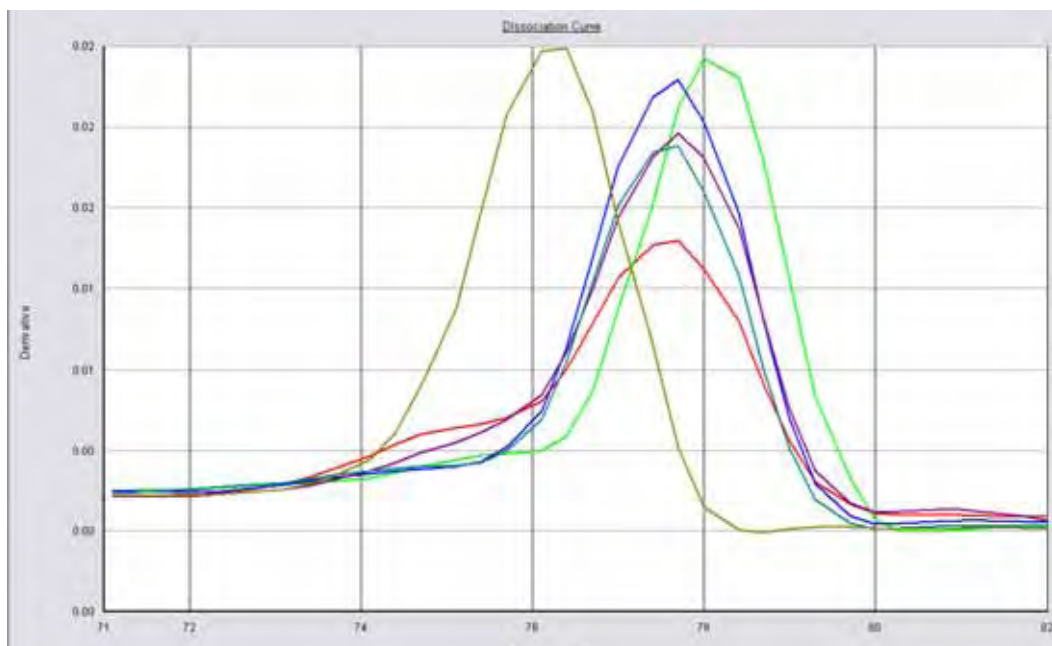


Figura 13. Curvas de dissociação da PCR em tempo real com uso dos “primers” HV+/HV-, relativas a seis estirpes do VBI. Pode ser observado o deslocamento dos picos de dissociação da estirpe M41 à esquerda (linha amarela), a sobreposição dos picos das estirpes vacinais H120, Ma5 e H52 com o da estirpe Connecticut (linhas Azul, roxa, verde escuro e vermelha), e o deslocamento à direita do pico de dissociação da estirpe SE 17 (linha verde).

Tabela 5. Valores de T_m obtidos a partir da RT-PCR em tempo real com uso dos “primers” HV+/HV-, e relação com a porcentagem de Citosina + Guanina (CG) e tamanho esperado dos fragmentos amplificados em pares de bases (pb) com base em seqüências cadastradas no GenBank.

Estirpes	Sorotipos	T_m^a	%CG	Pb
M41	Massachussets	76,16 (± 0,29)	30,40	191
H120	Massachussets	77,77 (± 0,12)	32,50	191
H52	Massachussets	77,77 (± 0,12)	31,40	191
Ma5	Massachussets	77,80 (± 0,14)	33,00	191
Connecticut	Connecticut	77,70 (± 0,05)	31,90	191
JMK	JMK	78,15 (± 0,07)	34,00	209
SE 17	SE 17	78,25 (± 0,21)	31,60	212
Iowa 609	Iowa	76,30 (± 0,14)	-	-
Iowa 97	Iowa	77,05 (± 0,07)	-	-
VBIPR02	-	77,60 (± 0,14)	-	-
VBIPR03	-	77,55 (± 0,21)	-	-
VBIPR07	-	77,63 (± 0,10)	-	-
VBIPR05	-	76,90 (± 0,14)	-	-
VBISP02	-	77,47 (± 0,12)	-	-
VBISC02	-	77,90 (± 0,20)	-	-
VBISC01	-	77,70 (± 0,00)	-	-
VBIPR06	-	77,67 (± 0,06)	-	-

^a Temperatura de dissociação (T_m) média e desvio padrão

(-) Ausência de dados

5.2.1 Análise estatística das temperaturas de dissociação

A análise das Tms obtidas a partir da dissociação realizada na técnica de rt RT-PCR com uso dos “primers” W+/W- pelo teste de Scott-Knott (1974) apresentou coeficiente de variação de 0,32%, média de 81,604°C e erro padrão de 0,1566; sendo possível separar as estirpes em quatro grupos de acordo com as Tms obtidas, que apresentaram diferença estatisticamente significativa entre si (Tabela 6). O grupo 1 foi constituído pelas estirpes: Connecticut, VBIPR02, VBIPR06 e VBISC02; o grupo 2 pelas estirpes: Iowa 97, Ma5, H52, Iowa 609, VBISC01, VBIPR03, VBIPR07 e VBISP02; o grupo 3 pelas estirpes: H120 e M41; e o grupo 4 foi constituído pelas estirpes: JMK, SE 17 e VBIPR05.

Já, no caso da análise das Tms obtidas a partir da dissociação realizada após a rt RT-PCR com uso dos “primers” HV+/HV- pelo teste de Scott-Knott (1974) foi encontrado um coeficiente de variação de 0,24%, uma Tm média de 77,424°C e um erro padrão de 0,117, sendo possível separar as estirpes em quatro grupos, de acordo com as Tms obtidas, que apresentaram diferença estatisticamente significativa entre si (Tabela 7). O grupo 1 foi formado pelas estirpes: M41 e Iowa 609; o grupo 2 pelas estirpes: Iowa 97 e VBIPR05; o grupo 3 pelas estirpes: Connecticut, H120, H52, Ma5, VBISP02, VBISC01, VBIPR03, VBIPR02, VBIPR07, VBIPR06 e VBISC02; e o grupo 4 pelas estirpes: JMK e SE 17.

Tabela 6. Análise estatística das Tms obtidas a partir da dissociação realizada após a rt RT-PCR com uso dos “primers” W+/W- pelo teste de Scott Knott (1974).

Estirpes	Tm Média	Resultado do teste	Classificação
VBIPR02	80.300000	a1	G1
VBIPR06	80.400000	a1	
VBISC02	80.600000	a1	
Connecticut	80.700000	a1	
VBISC01	81.166667	a2	G2
Iowa 97	81.266667	a2	
Ma5	81.300000	a2	
H52	81.333333	a2	
VBIPR03	81.333333	a2	
VBIPR07	81.333333	a2	
VBISP02	81.400000	a2	
Iowa 609	81.466667	a2	
H120	81.766667	a3	G3
M41	81.766667	a3	
VBIPR05	83.166667	a4	G4
JMK	83.400000	a4	
SE 17	83.700000	a4	

Tabela 7. Análise estatística das Tms obtidas a partir da dissociação realizada após a rt RT-PCR com uso dos “primers” HV+/HV- pelo teste de Scott-Knott (1974).

Estirpes	Tm Média	Resultado do teste	Classificação
M41	76.160000	a1	G1
Iowa 609	76.300000	a1	
VBIPR05	76.900000	a2	G2
Iowa 97	77.050000	a2	
VBISP02	77.466667	a3	G3
VBISC01	77.500000	a3	
VBIPR03	77.550000	a3	
VBIPR02	77.600000	a3	
VBIPR07	77.625000	a3	
VBIPR06	77.666667	a3	
Connecticut	77.700000	a3	
H120	77.766667	a3	
H52	77.766667	a3	
Ma5	77.800000	a3	
VBISC02	77.900000	a3	
JMK	78.150000	a4	G4
SE 17	78.250000	a4	

5.3 Relação entre os grupos discriminados pela rt RT-PCR e o alinhamento de estirpes do VBI com base nas seqüências de nucleotídeos das regiões HRV1 e HRV2 do gene S1

O alinhamento de seqüências gênicas de estirpes de referência utilizadas neste estudo e de isolados de campo brasileiros (seqüenciados na Universidade de São Paulo – USP) do VBI que estão cadastrados no Genbank (Tabela 8) foi utilizado como referencial para comparação com a diferenciação realizada pela análise das Tms obtidas da dissociação após a rt RT-PCR com as combinações de “primers” W+/W- e HV+/HV- (Figuras 14 e 16).

A partir do alinhamento das seqüências gênicas foram construídas árvores filogenéticas apresentadas nas Figuras 15 e 17.

Além desse alinhamento, foram avaliadas as porcentagens de CG das seqüências de nucleotídeos das duas regiões do gene S1 para cada uma das estirpes avaliadas (Tabela 8), sendo ainda informado, nas Tabelas 4 e 5, o número de pares de bases (pb) das estirpes de referência e o número de pares de bases das estirpes isoladas de campo, os quais corresponderam a produtos amplificados contendo 212 ou 228pb, para os pares de “primers” HV+/HV- e W+/W-.

Tabela 8. Estirpes do VBI utilizadas no alinhamento através do programa computacional BioEdit, respectivos números de acesso no GenBank e porcentagens de Citosina + Guanina (CG) dos fragmentos amplificados pelo uso dos pares de “primers” W+/W- e HV+/HV- (regiões gênicas HRV1 e HRV2 do gene S1).

Estirpe	Número de acesso	% CG (W+/W-)	% CG (HV+/HV-)
H120	M21970	41,20	32,50
H52	AF352315	41,20	31,40
Ma5	AY561713	41,20	33,00
M41	M21883	42,50	30,40
Connecticut	L18990	39,40	31,90
JMK	L14070	41,70	34,00
SE 17	AF239984	41,20	31,60
USP 01	DQ355995	38,60	34,00
USP 02	DQ448273	38,60	34,00
USP 03	DQ448277	39,00	32,50
USP 04	DQ492307	39,00	32,50
USP 05	DQ492308	40,80	33,50
USP 06	DQ492309	38,60	34,00
USP 07	DQ448274	38,60	34,00
USP 08	DQ492310	39,00	32,50
USP 09	DQ492311	38,60	34,00
USP 10	DQ448275	38,60	32,50
USP 11	DQ492312	39,00	32,50
USP 12	DQ448276	39,00	34,00

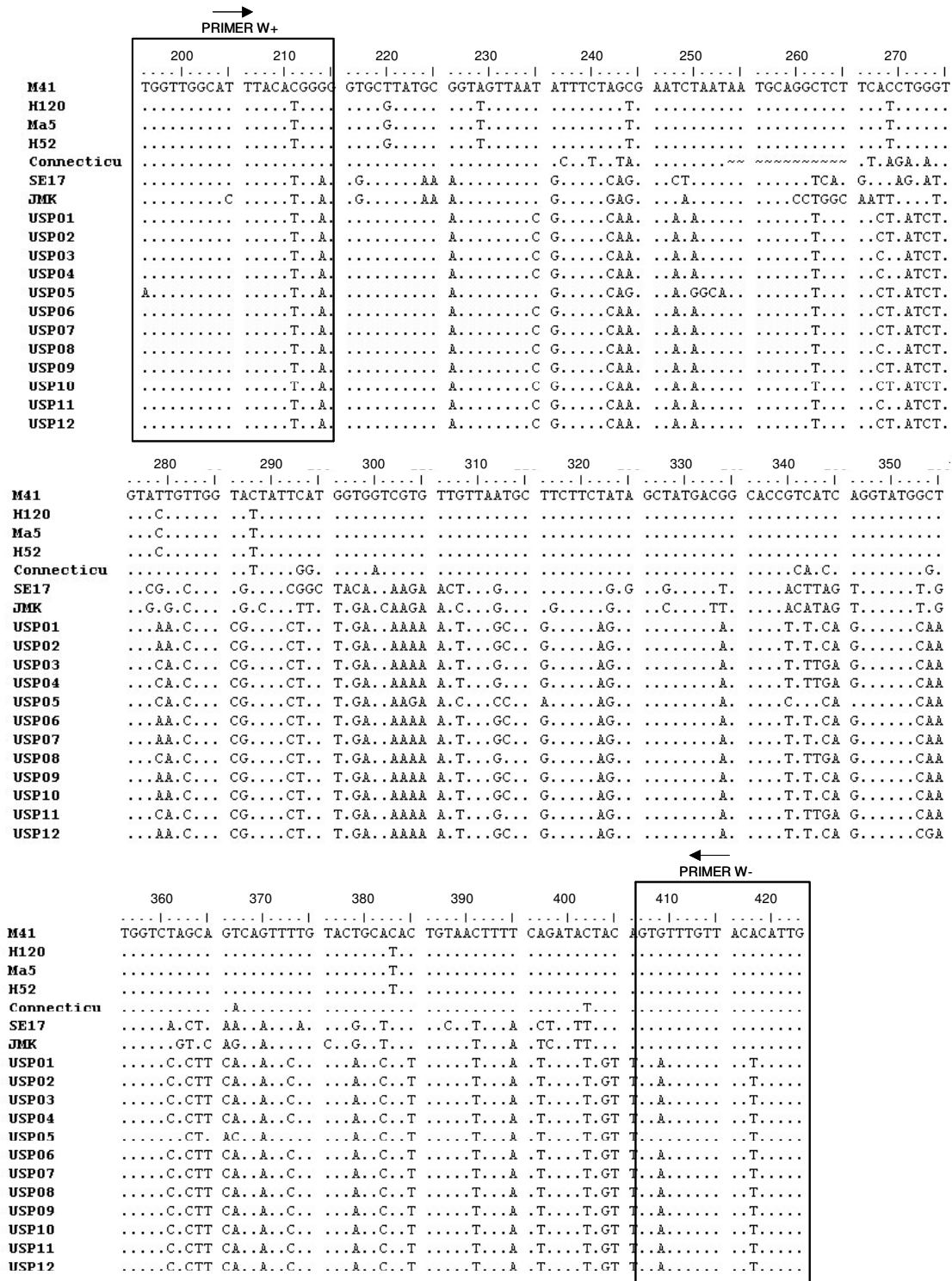


Figura 14. Alinhamento das seqüências gênicas do VBI cadastradas no GenBank (estirpes de referência e isolados de campo brasileiros) relativas a amplificação por rt RT-PCR através do uso dos “primers” W+/W- realizado no programa computacional BioEdit. Baseado na seqüência da estirpe M41 (M21883), sendo que a região HRV1 encontra-se entre 167-280pb.

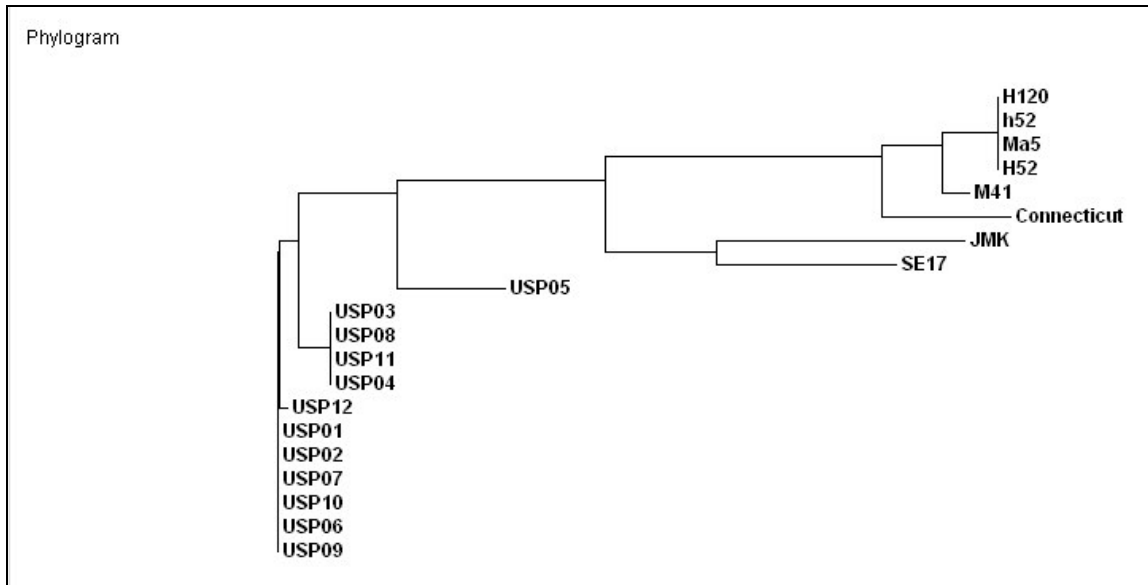


Figura 15. Árvore filogenética da região gênica amplificada pelos “primers” W+/W- de estirpes do VBI cadastradas no GenBank, construída através do uso do programa computacional Clustal W.

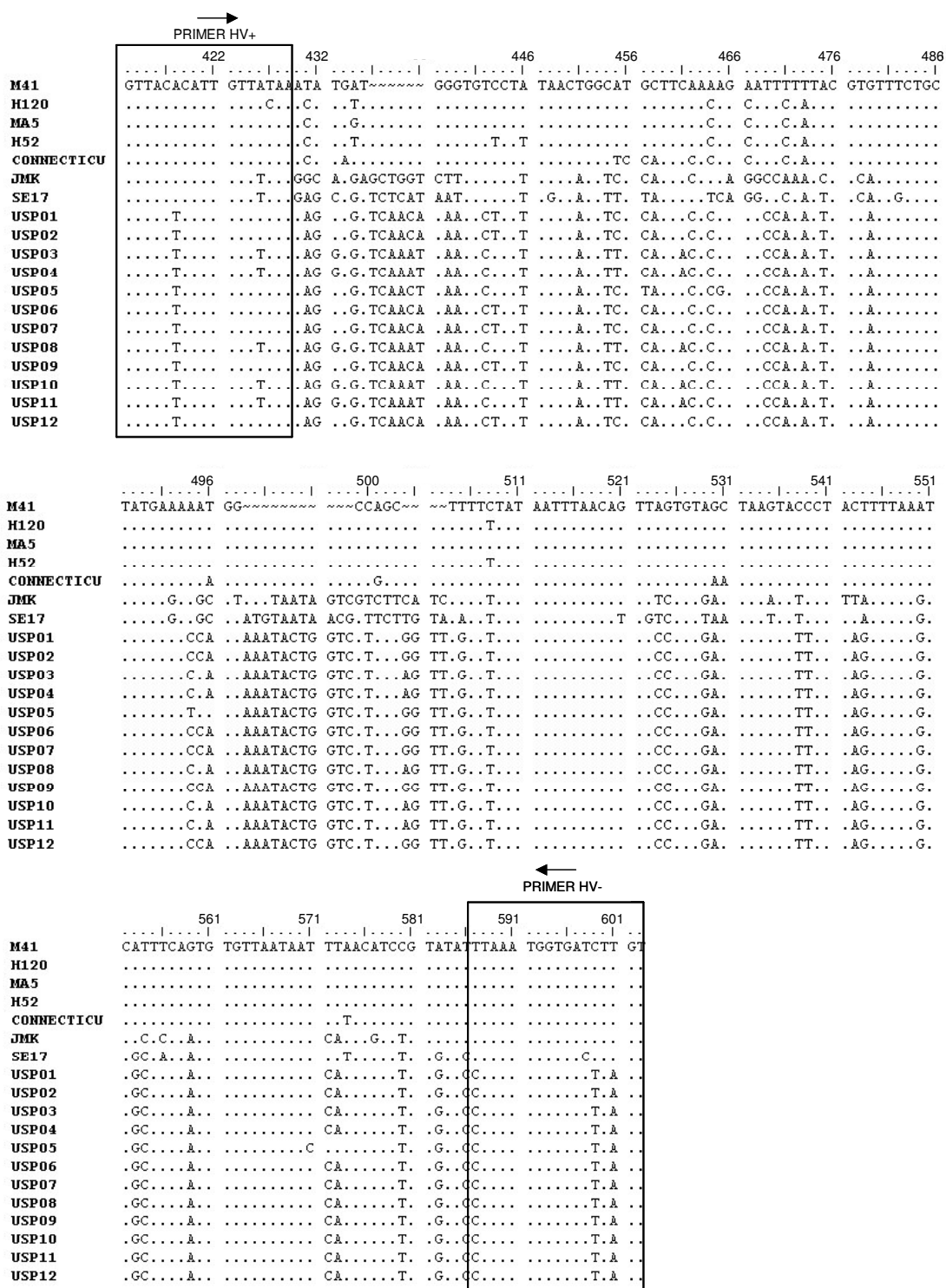


Figura 16. Alinhamento das seqüências gênicas do VBI cadastradas no GenBank (estirpes de referência e isolados de campo brasileiros) relativas a amplificação por rt RT-PCR através do uso dos “primers” HV+/HV- realizado no programa computacional BioEdit. Baseado na seqüência da estirpe M41 (M21883). Sendo que a região HRV2 encontra-se entre 488-526pb.

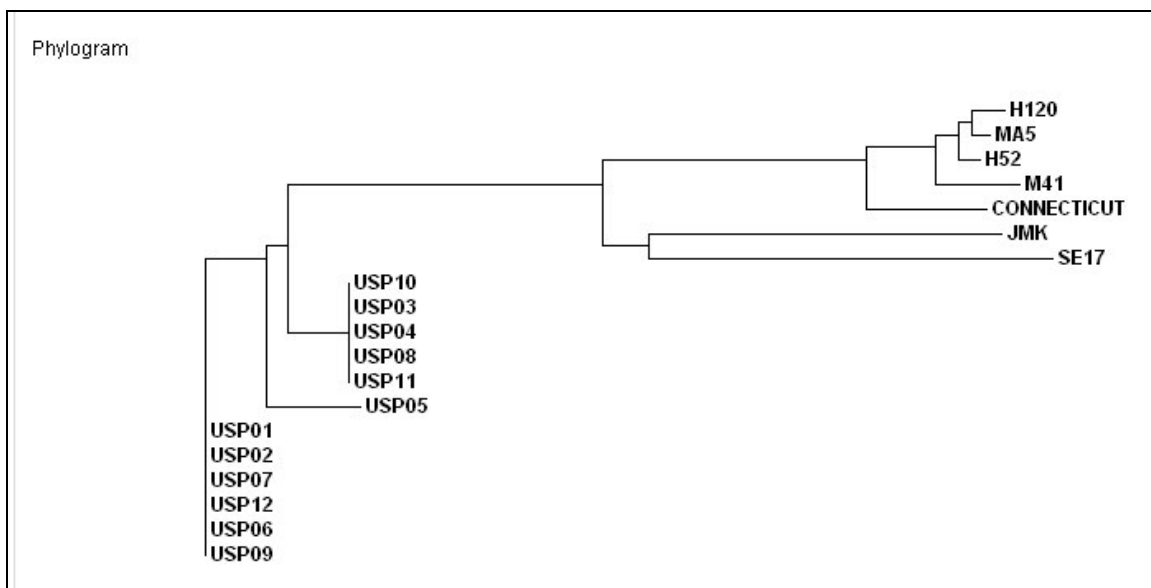


Figura 17. Árvore filogenética da região gênica amplificada pelos “primers” HV+/HV- de estirpes do VBI cadastradas no GenBank, construída através do uso do programa computacional Clustal W.

5.4 Avaliação da sensibilidade analítica

5.4.1 Avaliação da sensibilidade analítica a partir do LCA infectado com a estirpe M41 do VBI

A sensibilidade analítica revelou o mesmo limite de detecção para as duas técnicas de biologia molecular empregadas no presente estudo (RT-PCR convencional e RT-PCR em tempo real), e com ambos pares de oligonucleotídeos iniciadores testados (W+/W- e HV+/HV-), uma vez que a última diluição do LCA infectado onde foi detectado produtos amplificados do gene S1 foi de 10^{-5} . No caso da RT-PCR convencional o limite de detecção foi considerado como a última diluição na qual pôde ser evidenciado o produto amplificado em gel de agarose corado com brometo de etídeo, sob a forma de bandas com tamanhos específicos estimados para cada um dos pares de “primers” utilizados (Figura 18C). Já, em relação à técnica de RT-PCR em tempo real, a última diluição considerada positiva foi aquela que apresentou aumento exponencial durante a curva de amplificação com respectiva T_m específica durante a curva de dissociação (Figuras 18A, 18B e 19).

5.4.2 Avaliação da sensibilidade analítica a partir do cDNA da estirpe M41 do VBI

A sensibilidade analítica revelou o mesmo limite de detecção para as duas técnicas de biologia molecular empregadas no presente estudo (RT-PCR convencional e RT-PCR em tempo real), e com ambos pares de oligonucleotídeos iniciadores testados (W+/W- e HV+/HV-), uma vez que a última diluição detectada foi de 10^{-8} . No caso da RT-PCR convencional o limite de detecção foi considerado como a última diluição na qual pôde ser evidenciado o produto amplificado em gel de agarose corado com brometo de etídeo, sob a forma de bandas com tamanhos específicos estimados para cada um dos pares de “primers” utilizados (Figura 20C). Já, em relação à técnica

de RT-PCR em tempo real, a última diluição considerada positiva foi aquela que apresentou aumento exponencial durante a curva de amplificação com respectiva T_m específica durante a curva de dissociação (Figuras 20A , 20B e Figura 21).

5.4.3 Avaliação da sensibilidade analítica a partir do DNA plasmideal da estirpe M41 do VBI e construção da curva padrão

A sensibilidade analítica revelou o mesmo limite de detecção para as duas técnicas de biologia molecular empregadas no presente estudo (RT-PCR convencional e RT-PCR em tempo real), e com ambos pares de oligonucleotídeos iniciadores testados (W+/W- e HV+/HV-), uma vez que a última diluição detectada foi de 10^{-9} , equivalente a $1,32 \times 10^2$ unidades de cópias do gene S1. No caso da RT-PCR convencional o limite de detecção foi considerado como a última diluição na qual pôde ser evidenciado o produto amplificado em gel de agarose corado com brometo de etídeo, sob a forma de bandas com tamanhos específicos estimados para cada um dos pares de “primers” utilizados (Figura 22C). Já, em relação à técnica de RT-PCR em tempo real, a última diluição considerada positiva foi aquela que apresentou aumento exponencial durante a curva de amplificação com respectiva T_m específica durante a curva de dissociação (Figuras 22A , 22B e Figura 23).

Os valores de C(T) foram utilizados para calcular e traçar uma linha de regressão linear contra o valor correspondente do logaritmo do número de moles do “template” e a equação linear gerada a partir da curva padrão foi $y = -0,311 x + 16,859$ com coeficiente de correlação (r^2) = 0,9933 (Figura 24). O teste manteve linearidade por no mínimo sete ordens de magnitude, e usando-se o coeficiente angular da equação linear, a eficiência do teste foi estimada em 93,06%. O teste foi negativo para amostras com número de cópias inferior a 100. O desvio padrão dos valores de C(T) obtidos para cada reação contendo de 10^8 a 10^2 cópias de DNA calculadas a partir de sete corridas independentes, variou de 0,075 a 0,7585 ciclos.

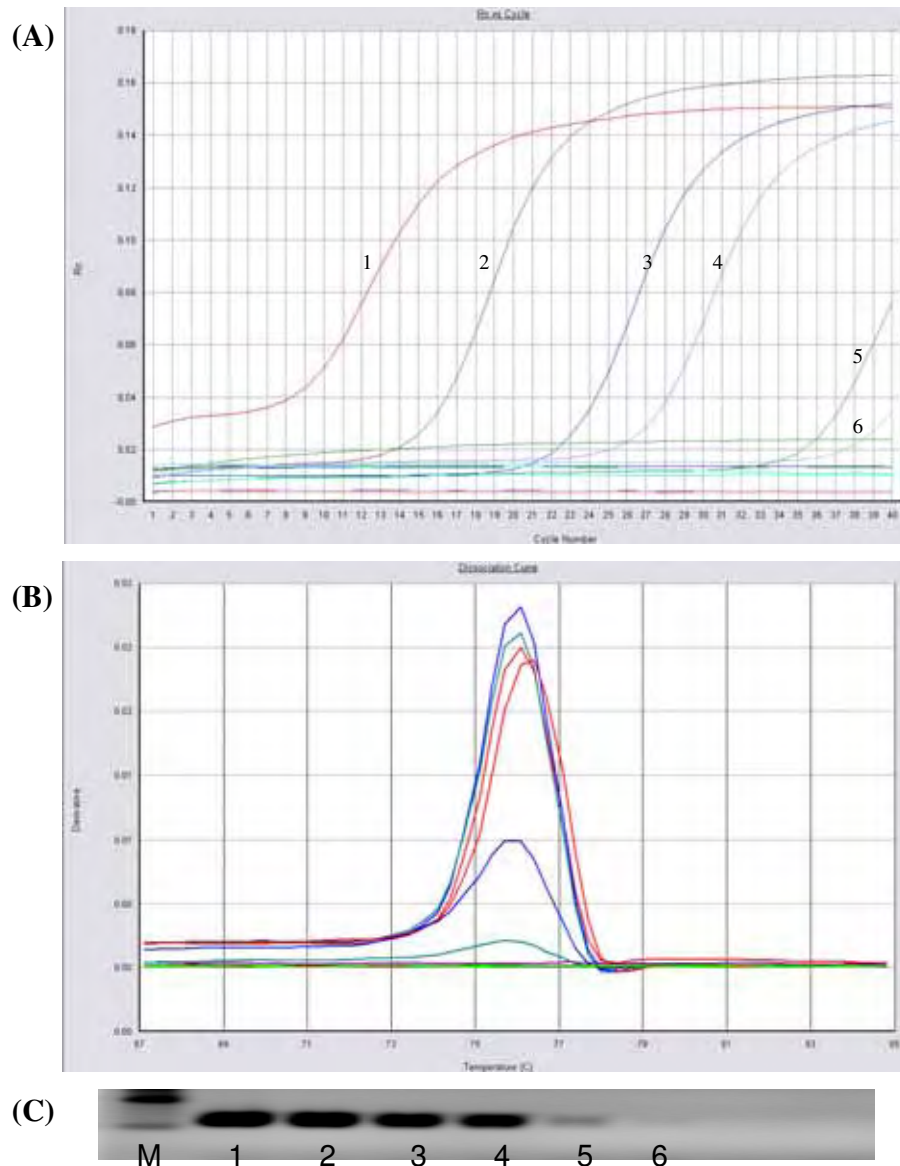


Figura 18. Avaliação da sensibilidade analítica da RT-PCR convencional e da RT-PCR em tempo real, em relação a estirpe M41 do VBI. O LCA foi submetido a diluições seriadas de razão 10 (10^0 a 10^{-10}) e então processado pelas técnicas de RT-PCR em tempo real (A e B) e RT-PCR convencional (C). Legenda M: Marcador 100bp Ladder (Invitrogen), 1-6: produto amplificado a partir das diluições de razão 10, de 10^0 a 10^{-5} .

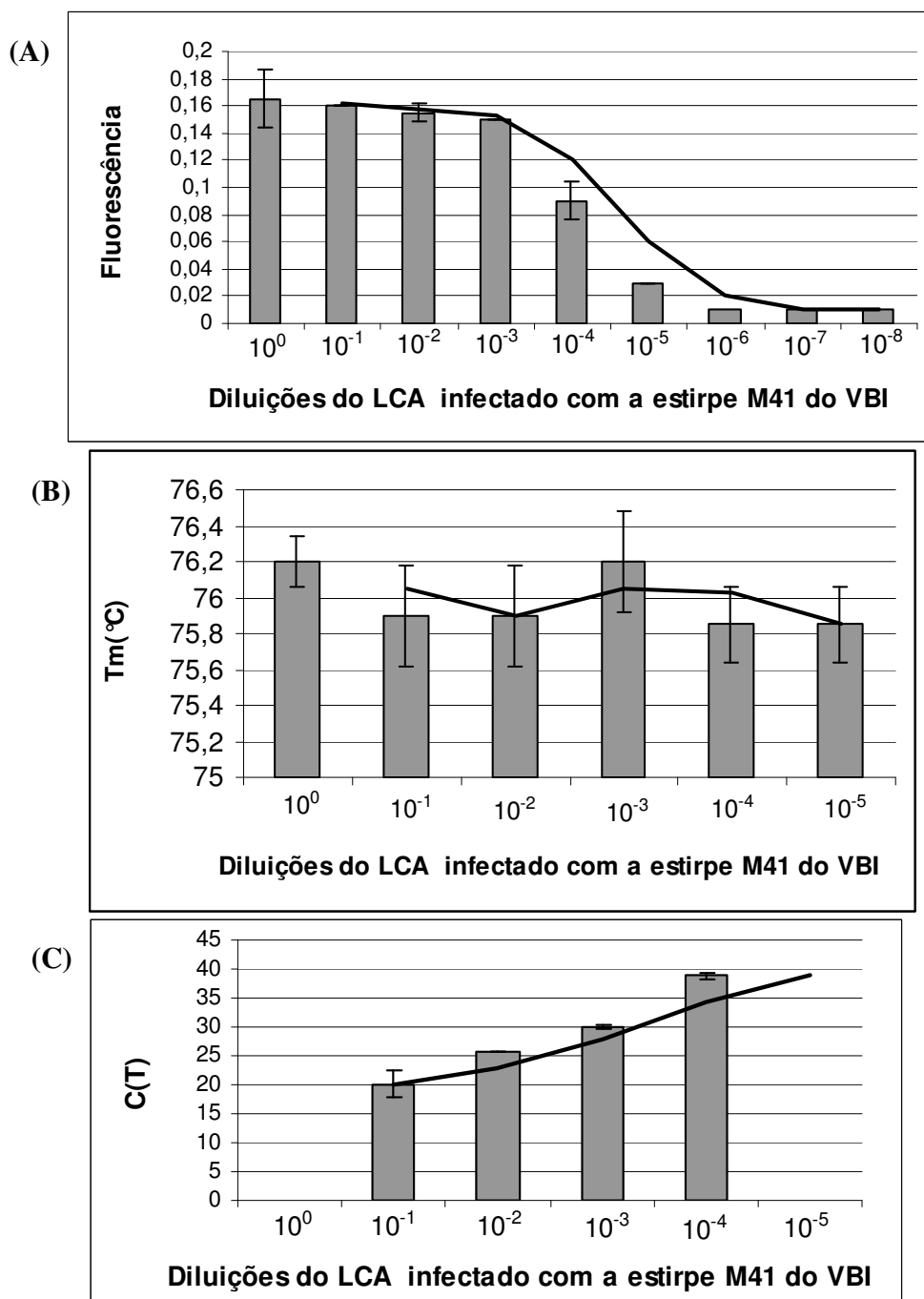


Figura 19. Valores (média e desvio padrão) obtidos a partir da rt RT-PCR com uso dos “primers” HV+/HV- no teste de sensibilidade analítica a partir da diluição do LCA infectado com a estirpe M41. (A) Valores de fluorescência. (B) Valores de Tm (°C). (C) Valores de Ct.

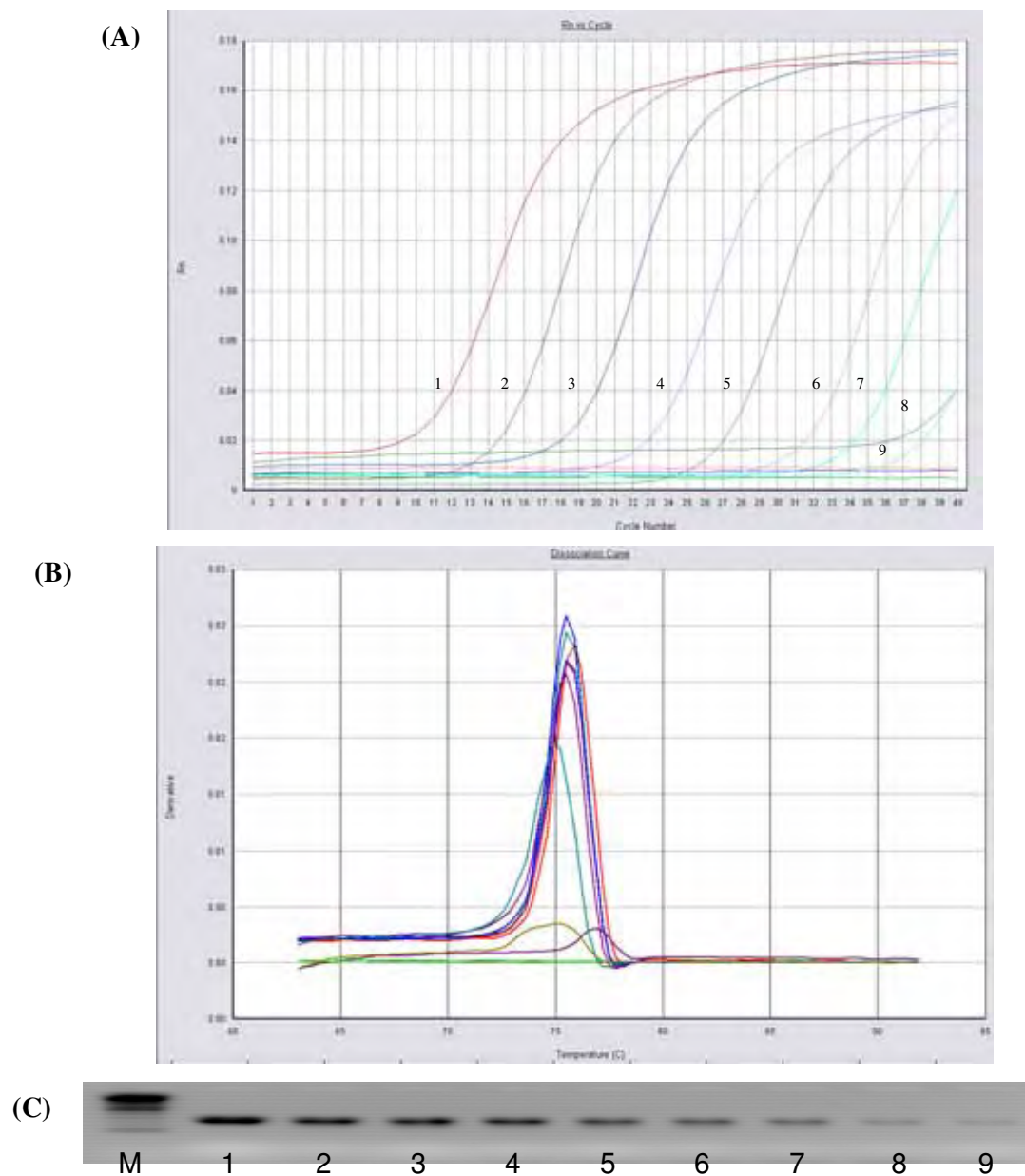


Figura 20. Avaliação da sensibilidade analítica da RT-PCR convencional e da RT-PCR em tempo real em relação a estirpe M41 do VBI. O cDNA foi submetido a diluições seriadas de razão 10 (10^0 a 10^{-10}) e então processado pelas técnicas de RT-PCR em tempo real (A e B) e RT-PCR convencional (C). Legenda M: Marcador 100bp Ladder (Invitrogen), 1-9: produto amplificado a partir das diluições de razão 10, de 10^0 a 10^{-8} .

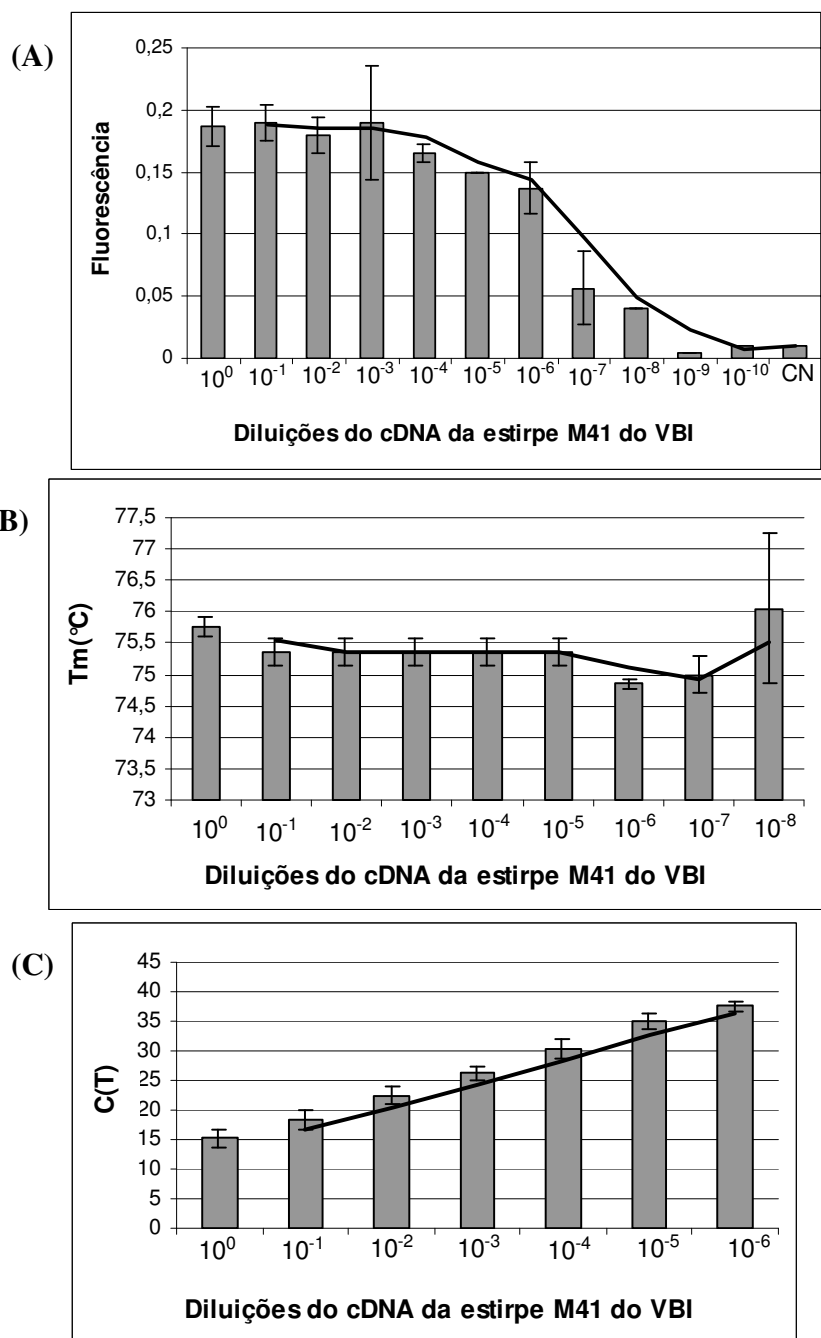


Figura 21. Valores (média e desvio padrão) obtidos a partir da rt RT-PCR com uso dos “primers” HV+/HV- no teste de sensibilidade analítica a partir da diluição do cDNA da estirpe M41. (A) Valores de fluorescência. (B) Valores de Tm (°C). (C) Valores de CT.

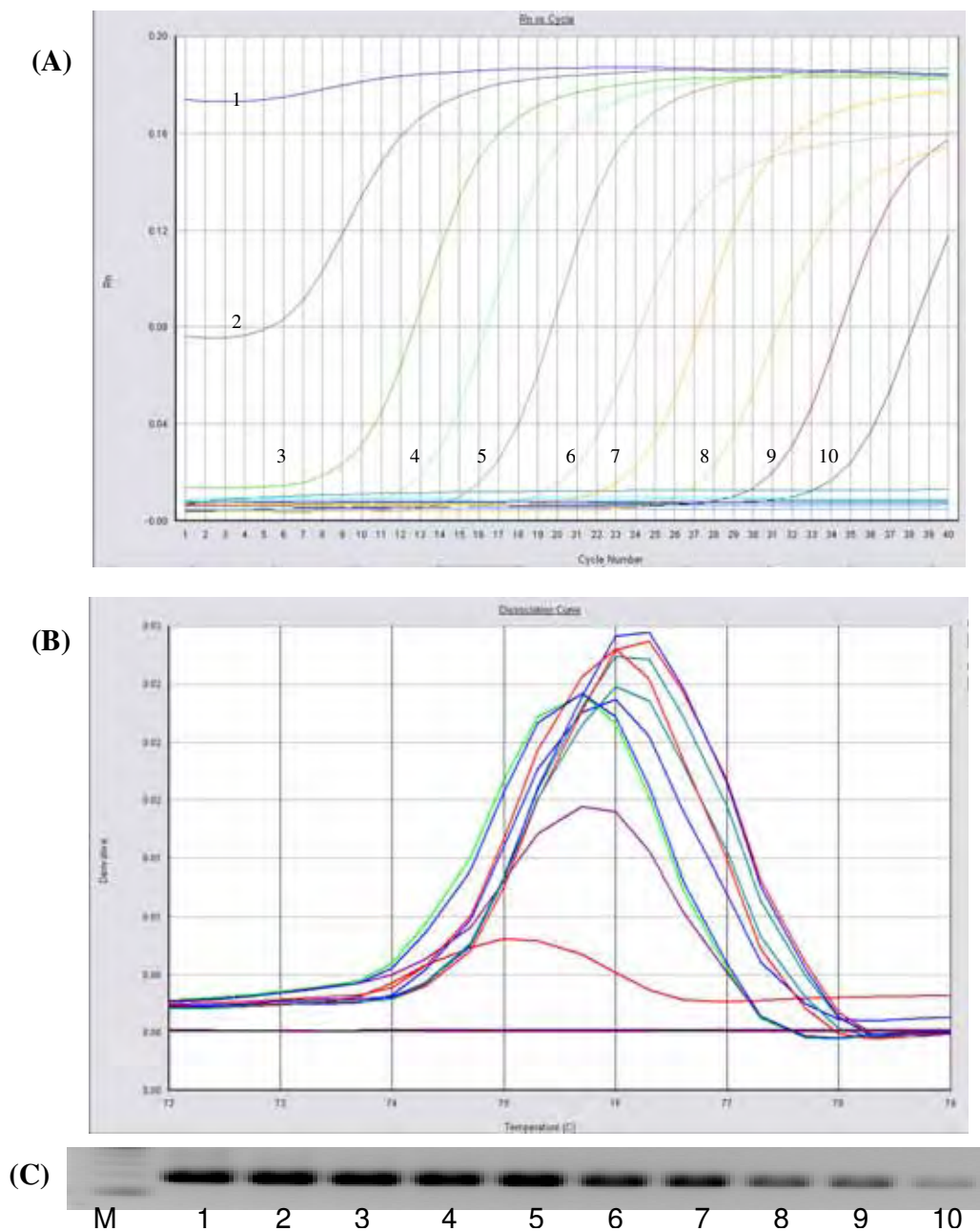


Figura 22. Avaliação da sensibilidade analítica da RT-PCR convencional e da RT-PCR em tempo real em relação a estirpe M41 do VBI. O DNA plasmidial foi submetido a diluições seriadas de razão 10 (10^0 a 10^{-11}) e então processado pelas técnicas de RT-PCR em tempo real (A e B) e RT-PCR convencional (C). Legenda M: Marcador 100bp Ladder (Invitrogen), 1-10: produto amplificado a partir das diluições de razão 10, de 10^0 a 10^{-9} .

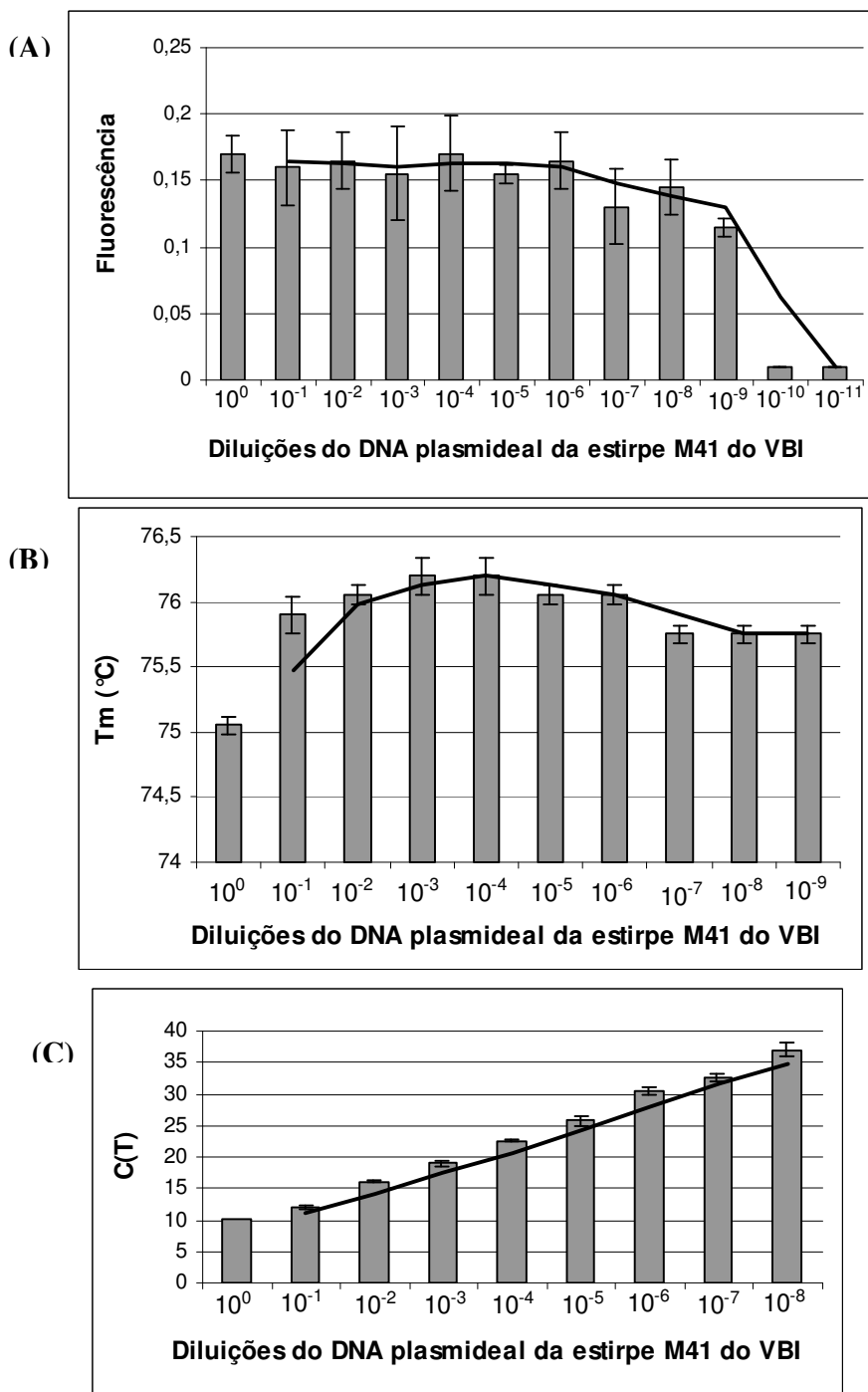


Figura 23. Valores (média e desvio padrão) obtidos a partir da rt RT-PCR com uso dos “primers” HV+/HV- no teste de sensibilidade analítica a partir da diluição do DNA plasmideal da estirpe M41. (A) Valores de fluorescência. (B) Valores de Tm (°C). (C) Valores de Ct.

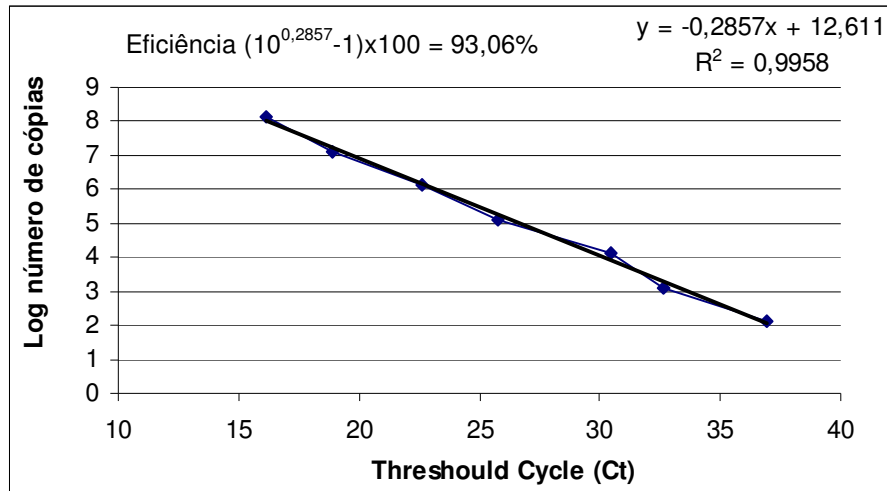


Figura 24. A curva padrão foi gerada através do uso dos valores de C(T) vs. Log_{10} das diluições seriadas de razão 10 (10^{-3} a 10^{-9}) do DNA plasmideal correspondente ao gene S1 do VBI. A eficiência da reação foi de 93,06%, estimada com base no coeficiente angular da reta como indicado pela fórmula.

5.5 Determinação da especificidade analítica

A especificidade analítica das técnicas de RT-PCR convencional e de RT-PCR em tempo real realizadas com ambos pares de “primers” (W+/W- e HV+/HV-) foi comprovada, já que nenhum dos vírus heterólogos testados (vírus da doença de Newcastle, vírus da doença de Gumboro e Pneumovirus) geraram produtos amplificados específicos (Figuras 25 e 26).

Além disso, deve ser destacado que o teste de especificidade analítica com a combinação de “primers” W+/W- apresentou uma pequena amplificação inespecífica para o vírus da doença de Newcastle, somente na reação de PCR em tempo real. No entanto, tais produtos inespecíficos foram facilmente diferenciados, devido à baixa T_m obtida (dados não apresentados).

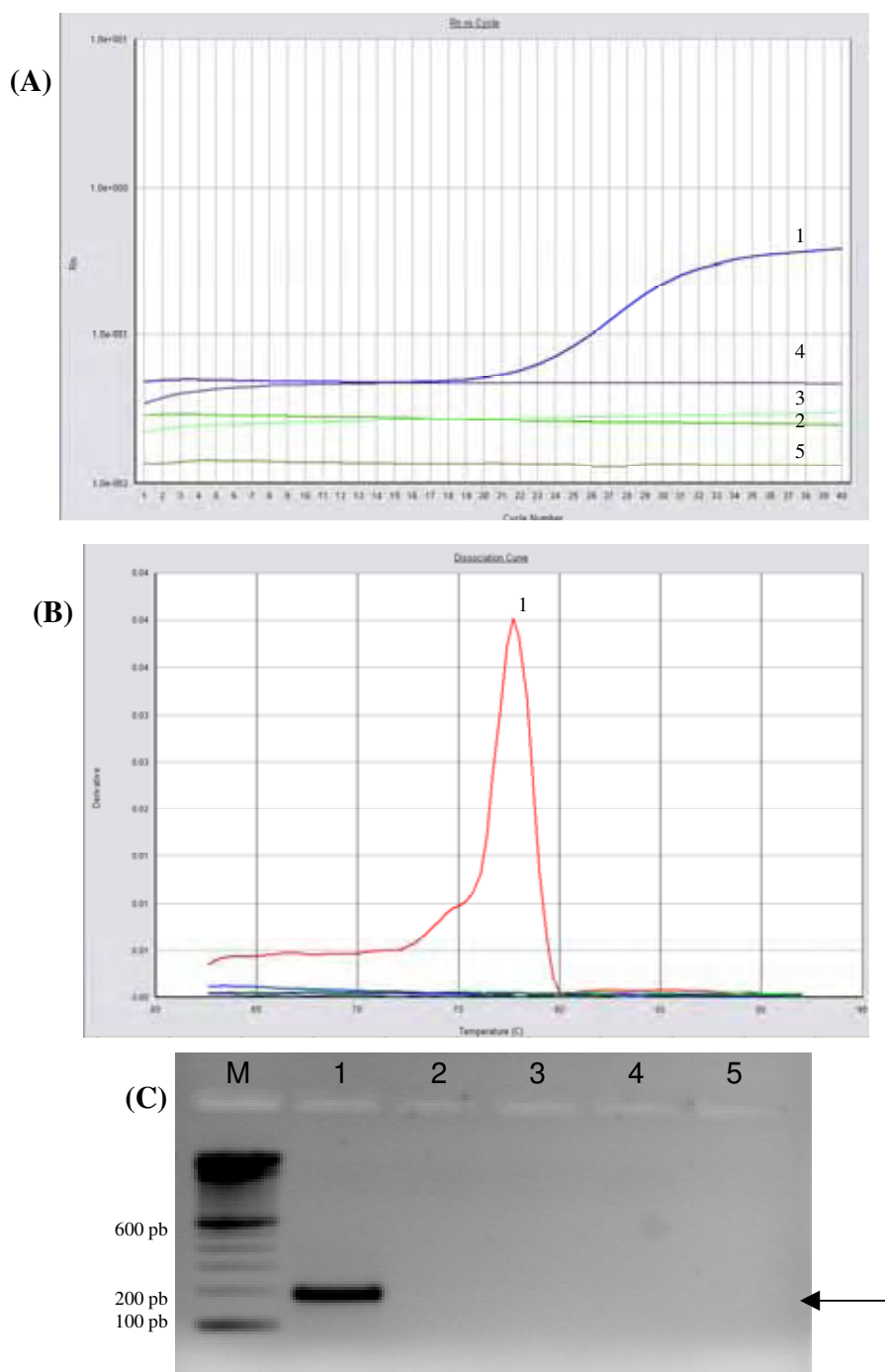


Figura 25. Teste de especificidade analítica da RT-PCR em tempo-real (A e B) e a convencional (C) com uso dos “primers” HV+ / HV-. Legenda: (M) Marcador 100bp. (1) vírus da BI - estirpe M41. (2) vírus da doença de Newcastle. (3) Pneumovirus aviário. (4) vírus da doença de Gumboro. (5) Controle negativo

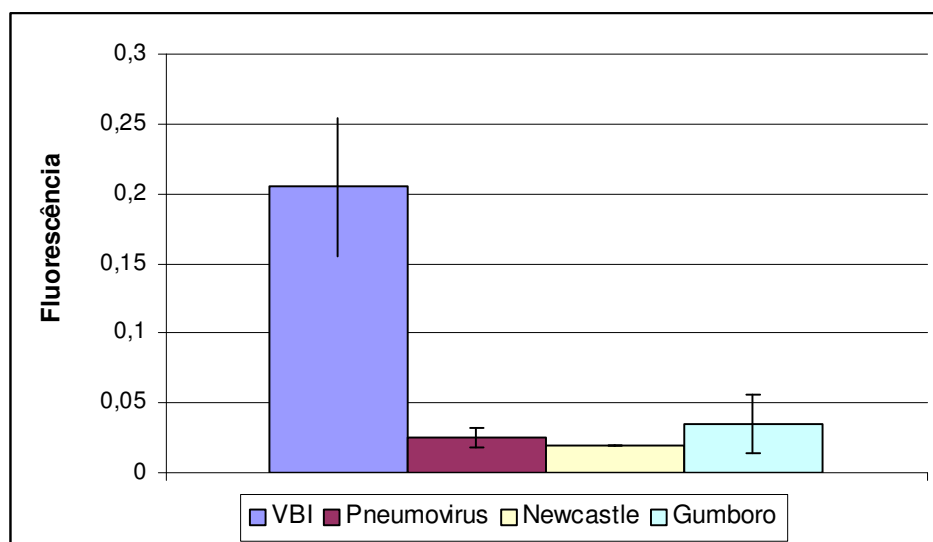


Figura 26. Fluorescência obtida a partir da amplificação por RT-PCR em tempo real com a utilização dos “primers” HV+/HV- para diferentes vírus.

5.6 Detecção do VBI em aves infectadas experimentalmente com estirpe M41

Durante a infecção experimental, as aves foram avaliadas diariamente quanto a presença de sinais clínicos, tais como estertores tráqueo-bronquiolares (“ronqueira”), tosses, espirros e descargas nasais, tendo sido observada a presença desses sinais de forma evidente, desde o segundo até o oitavo dia pós infecção, sendo que posteriormente os sinais clínicos foram abrandados até desaparecerem por completo, constituindo então a fase de convalescença da doença (Figura 35).

No presente estudo ficou evidenciado que, independentemente das duas técnicas de RT-PCR ou dos pares de “primers” usados, obteve-se uma mesma cinética de detecção do vírus nas amostras teciduais de aves experimentalmente infectadas com a estirpe M41 do VBI. As amostras de traquéia revelaram-se positivas do 1º ao 20º dpi, enquanto que as amostras de pulmão foram positivas do 2º ao 15º dpi. Para efeito de comparação, deve ser destacado que a técnica de isolamento viral em ovos embrionados de galinhas demonstrou positividade para as amostras de traquéia ou de pulmão colhidas das aves apenas no período do 2º ao 9º dpi (Figuras 27 e 35). Portanto, ficou claramente demonstrada uma maior sensibilidade das técnicas de RT-PCR convencional e de RT-PCR em tempo real em relação ao método padrão de diagnóstico laboratorial do VBI, que é o isolamento em ovos embrionados (Tabela 9). Esses resultados destacam também a importância dos métodos de biologia molecular na detecção do VBI em aves que se encontram em fase de convalescença da doença, ocasião em que a quantidade de vírus presente no sistema respiratório (traquéia e pulmão) encontra-se mais reduzida, e talvez com uma menor atividade infectante (Figuras 28 a 34).

Os valores de C(T) e de fluorescência obtidos na rt RT-PCR a partir de amostras de pulmão das aves experimentalmente infectadas com a estirpe M41, não representam um referencial tão seguro da quantidade de vírus por intervalo da infecção, devido à ausência de homogeneidade deste órgão, como pôde ser observado na Figura 31B, onde os valores de C(T) e de fluorescência encontram-se diminuídos nos dias 5 e 6 pi,

quando se esperava valores iguais ou superiores aos dias 3, 4, 7 e 8 pi, se fossem considerados os dias críticos da fase aguda da infecção.

Ao contrário, as amostras de traquéia, tendo em vista a forma de processamento a que foram submetidas e o local onde foram realizados raspados da mucosa interna, permitiram que fossem obtidas amostras mais homogêneas e capazes de apresentarem resultados na técnica de PCR em tempo real com uma melhor correlação com a quantidade de vírus existente e de acordo com o intervalo pós-infecção analisado. Na Figura 34B pode ser observada uma diminuição dos valores de C(T) nos intervalos 2, 3 e 4dpi, ou seja, durante o período de maior replicação do vírus.

Dessa forma, pode-se considerar que a traquéia se constitui na amostra de eleição para a detecção do vírus pelas técnicas de biologia molecular aqui desenvolvidas, já que a detecção do vírus foi obtida desde o 1º até o 20º dpi, além de as amostras desse órgão permitirem que se alcançasse uma melhor correlação com a quantidade de vírus aí existente. Deve ser enfatizado, nesse caso, que para confirmação da reprodutibilidade dos resultados, foram realizadas duas repetições dos protocolos de extração de RNA.



Figura 27. Fotos ilustrando a presença de lesões em embriões provenientes do isolamento viral a partir de amostras de infecção experimental com a estirpe M41 do VBI. Legenda: N - embriões normais de galinha com 17 dias de incubação, e I - embriões de galinha com a mesma idade, apresentando graus de lesões em ordem decrescente da esquerda para a direita.

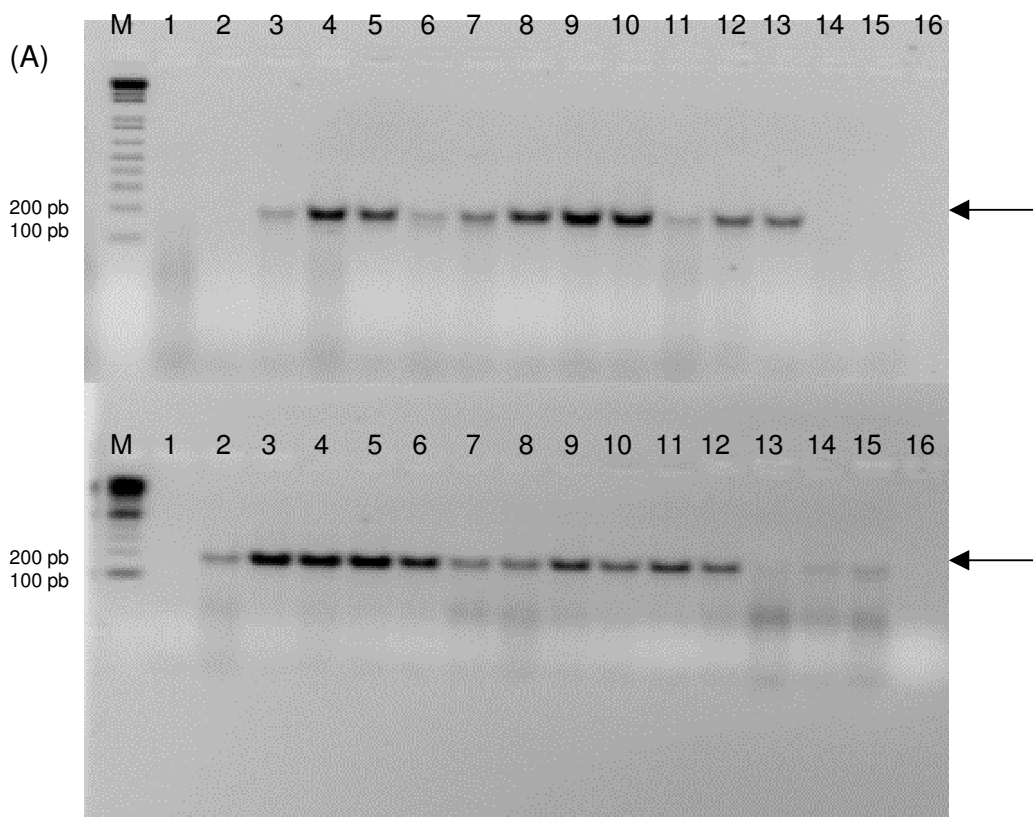


Figura 28. Detecção do VBI em aves experimentalmente infectadas com a estirpe M41 por RT-PCR convencional com os “primers” HV+ e HV-. (A) Amostras de pulmão: M - Marcador 1 kb plus Ladder, 1 - Controle negativo da infecção experimental, 2 a 15- amostras coletadas nos seguintes intervalos: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 17 e 20 dpi, 16 - Controle negativo da PCR. (B) Amostras de traquéia: M - Marcador 100 bp Ladder - Controle negativo da infecção experimental, 2 a 15- amostras coletadas nos seguintes intervalos: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 17 e 20 dpi, 16 - Controle negativo da PCR

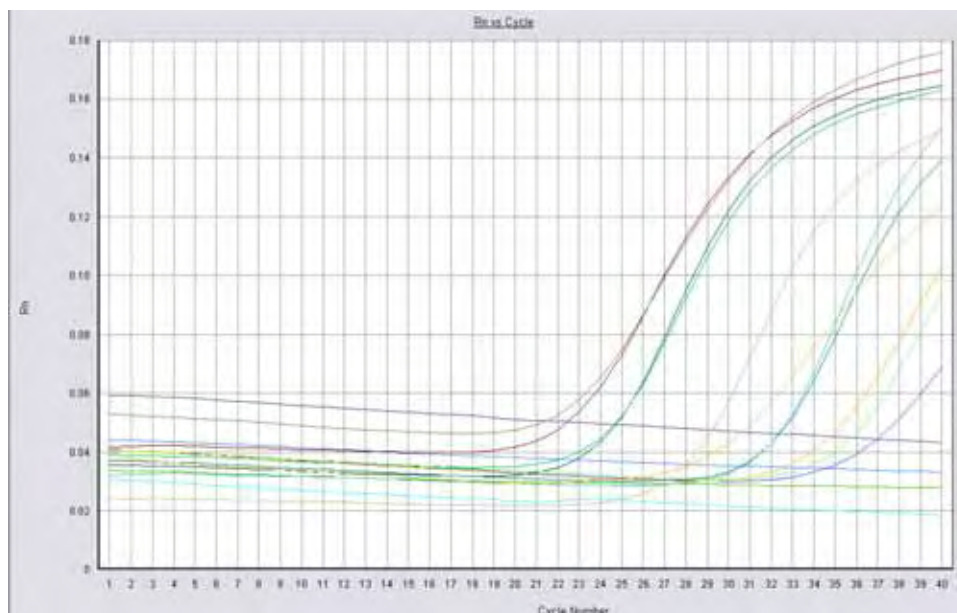


Figura 29. Curvas de amplificação da RT-PCR em tempo real com uso dos “primers” HV+/HV- a partir de amostras de pulmão das aves experimentalmente infectadas com a estirpe M41 do VBI .

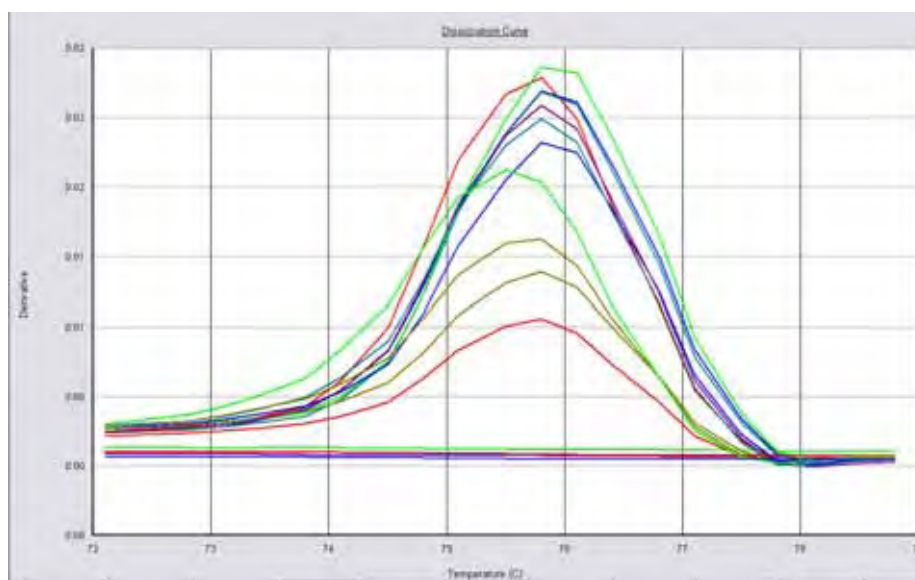


Figura 30. Curvas de dissociação da RT-PCR em tempo real com uso dos “primers” HV+/HV- a partir de amostras de pulmão das aves experimentalmente infectadas com a estirpe M41 do VBI.

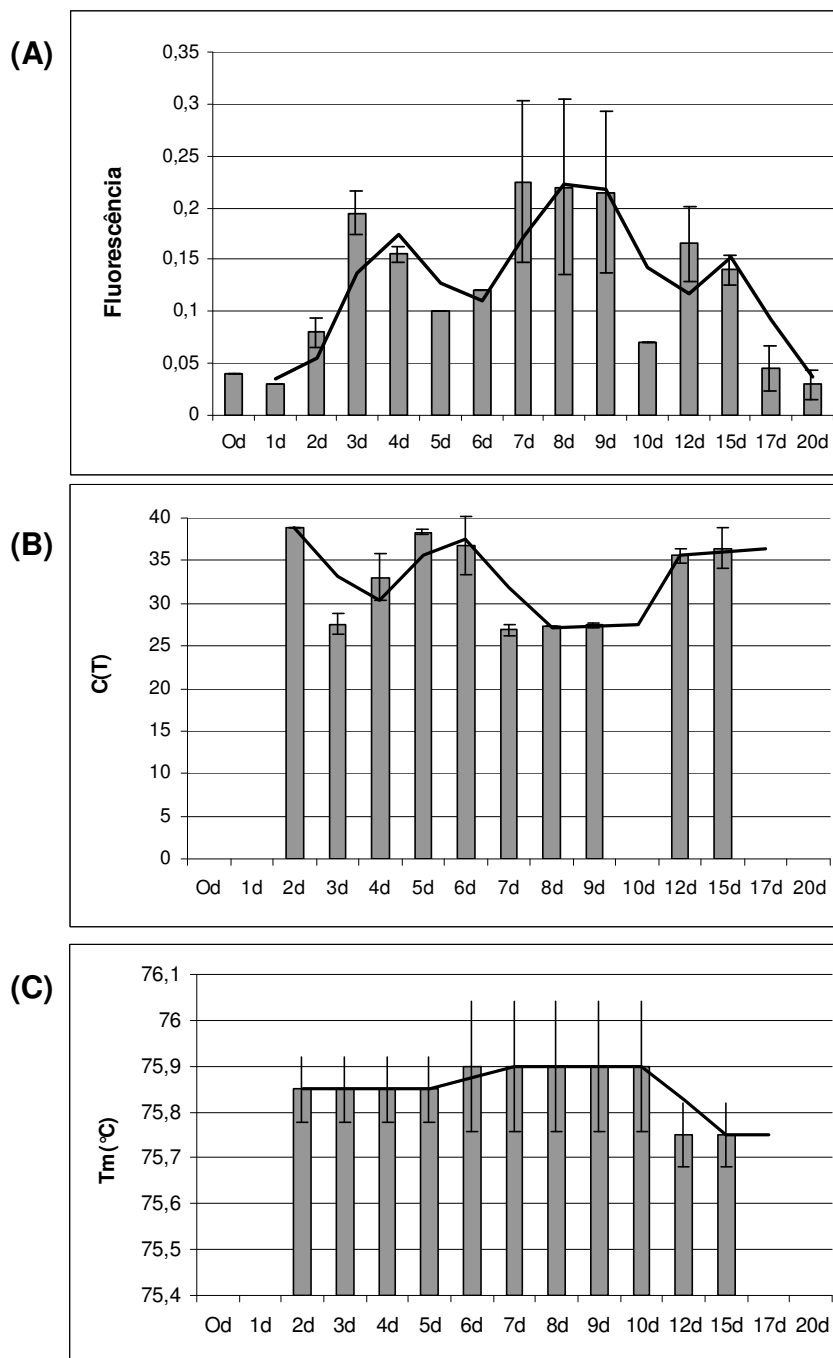


Figura 31. Detecção do VBI por rt RT-PCR com uso dos “primers” HV+/HV- em amostras de pulmão das aves infectadas experimentalmente com estirpe M41 da BIG. (A) Valores de fluorescência obtidos em cada intervalo p.i. (B) Valores de Ct obtidos em cada intervalo p.i. (C) Valores de Tm obtidos em cada intervalo p.i.

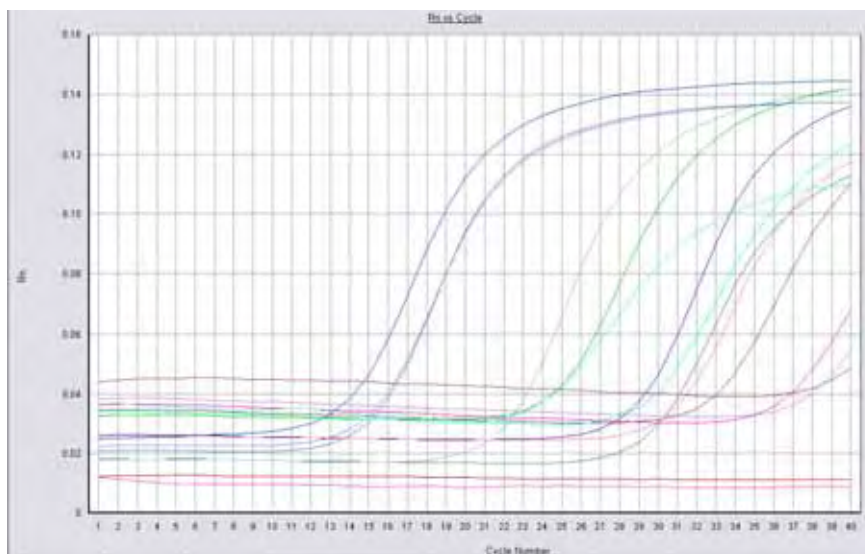


Figura 32. Curvas de amplificação da RT-PCR em tempo real com uso dos “primers” HV+/HV- a partir de amostras de traquéia das aves experimentalmente infectadas com a estirpe M41 do VBI .

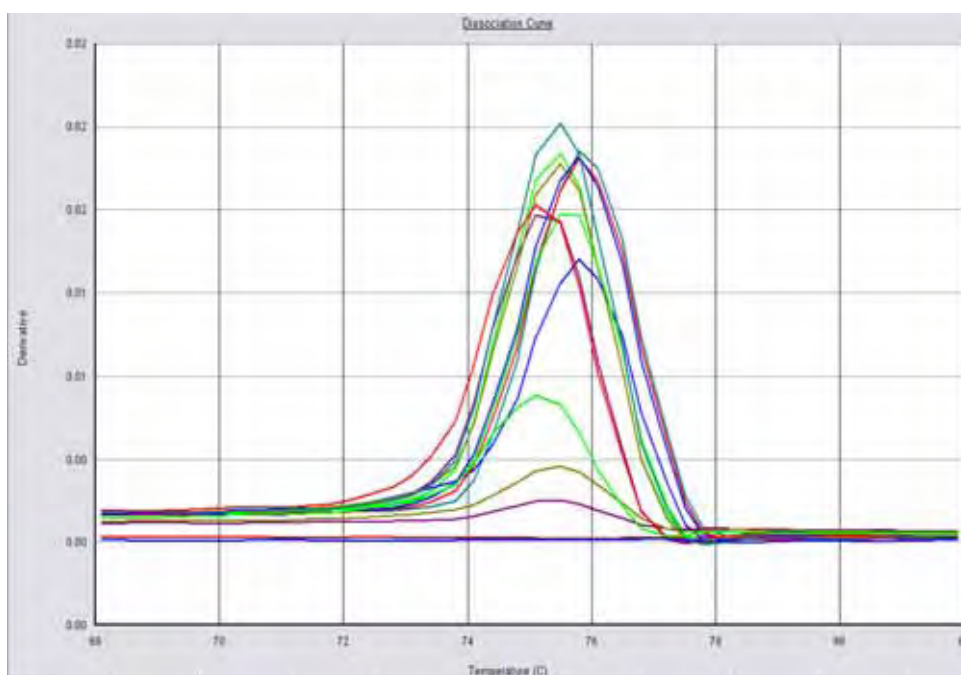


Figura 33. Curvas de dissociação da RT-PCR em tempo real com uso dos “primers” HV+/HV- a partir de amostras de traquéia das aves experimentalmente infectadas com a estirpe M41 do VBI.

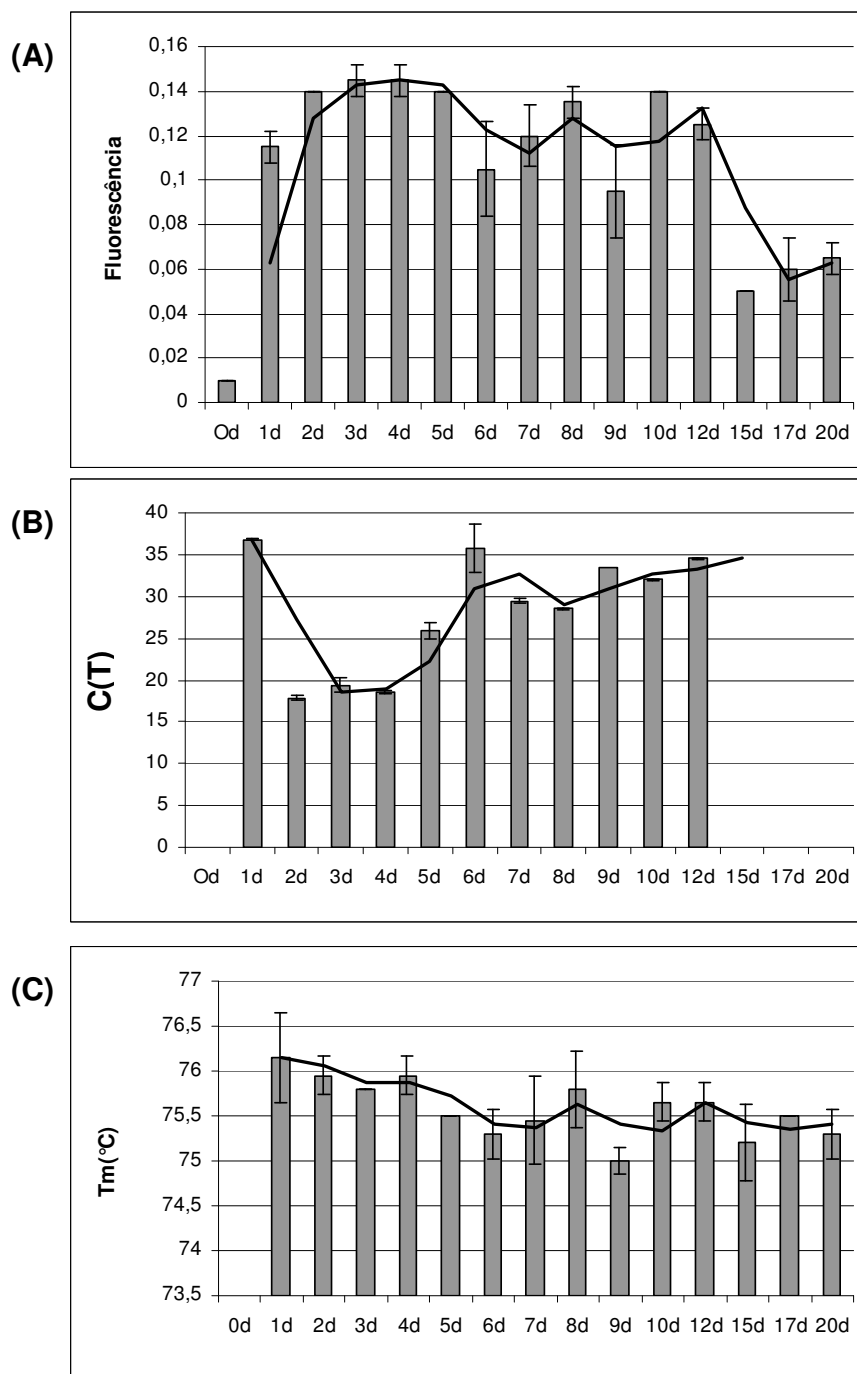


Figura 34. Detecção do VBI por rt RT-PCR com uso dos “primers” HV+/HV- em amostras de traquéia das aves infectadas experimentalmente com estirpe M41 da BIG. (A) Valores de fluorescência obtidos em cada intervalo p.i. (B) Valores de CT obtidos em cada intervalo p.i. (C) Valores de Tm obtidos em cada intervalo p.i.

Presença de S.C.										Ausência de S.C.										
dpi																				
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	17	20						
-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	IV P					
-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	PC P					
-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	RT P					
-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	IV T					
-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	PC T					
-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	RT T					

Figura 35. Detecção do VBI nos diferentes dias pós infecção (dpi), em aves com presença ou na ausência de sinais clínicos (S.C)^a, através de diferentes técnicas: Isolamento viral a partir de amostras de pulmão (IV P)^b, RT-PCR convencional a partir de amostras de pulmão (PC P)^c, RT-PCR em tempo real a partir de amostras de pulmão (RT P)^d, Isolamento viral a partir de amostras de traquéia (IV T)^b, RT-PCR convencional a partir de amostras de traquéia (PC T)^c e RT-PCR em tempo real a partir de amostras de traquéia (RT T)^d.

^a Os sinais clínicos observados foram: tosse, espirros, estertores tráqueo-bronquiolares (ronqueira), descargas nasais.

^b Amostras foram analisadas conforme a presença (+) ou ausência (-) de lesões de nanismo, enrolamento e/ou hemorragia, foram realizadas 3 passagens.

^c O método de detecção empregado foi a presença (+) ou ausência (-) de bandas visualizadas através da eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídeo.

^d As amostras que apresentaram crescimento exponencial na curva de amplificação e Tm específicas foram consideradas positivas (+), as demais foram consideradas negativas (-).

Tabela 9. Frequência de detecção do VBI através dos métodos de isolamento viral (IV)^a, RT-PCR convencional^b e RT-PCR em tempo real^c em amostras de traquéia e pulmão de aves experimentalmente infectadas com a estirpe M41, nos diferentes dias pós-infecção (dpi).

	Pulmão	Traquéia	Média
IV	8/14 (57,14%)	8/14 (57,14%)	8/14 (57,14%)
RT-PCR	11/14 (78,57%)	14/14 (100%)	12,5/14 (89,29%)
rt RT-PCR	11/14 (78,57%)	14/14(100%)	12,5/14 (89,29%)

^a Amostras foram analisadas conforme a presença (+) ou ausência (-) de lesões de nanismo, enrolamento e/ou hemorragia, foram realizadas 3 passagens.

^b O método de detecção empregado foi a presença (+) ou ausência (-) de bandas visualizadas através da eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídeo.

^c As amostras que apresentaram crescimento exponencial na curva de amplificação e Tm específicas foram consideradas positivas (+), as demais foram consideradas negativas (-).

5.7. Detecção do VBI em aves infectadas experimentalmente com vacina comercial atenuada

A detecção do VBI nas aves infectadas experimentalmente com a vacina comercial atenuada (H120) através das técnicas de RT-PCR convencional e de RT-PCR em tempo real foi a mesma, tanto para as amostras de traquéia como para as amostras de pulmão. As amostras de traquéia revelaram-se positivas em todos os intervalos coletados (3°, 5° e 12° dpi.), no entanto, as amostras de pulmão somente foram positivas no 3° dpi (Figuras 41 e 42 e Tabela 10). Para efeito de comparação deve ser destacado que a técnica de isolamento viral em ovos embrionados de galinhas demonstrou positividade para as amostras de traquéia ou de pulmão colhidas das aves apenas no 3° dpi. Portanto, ficou claramente demonstrada uma maior sensibilidade das técnicas de RT-PCR convencional e de RT-PCR em tempo real em relação ao método padrão de diagnóstico laboratorial do VBI, que é o isolamento em ovos embrionados.

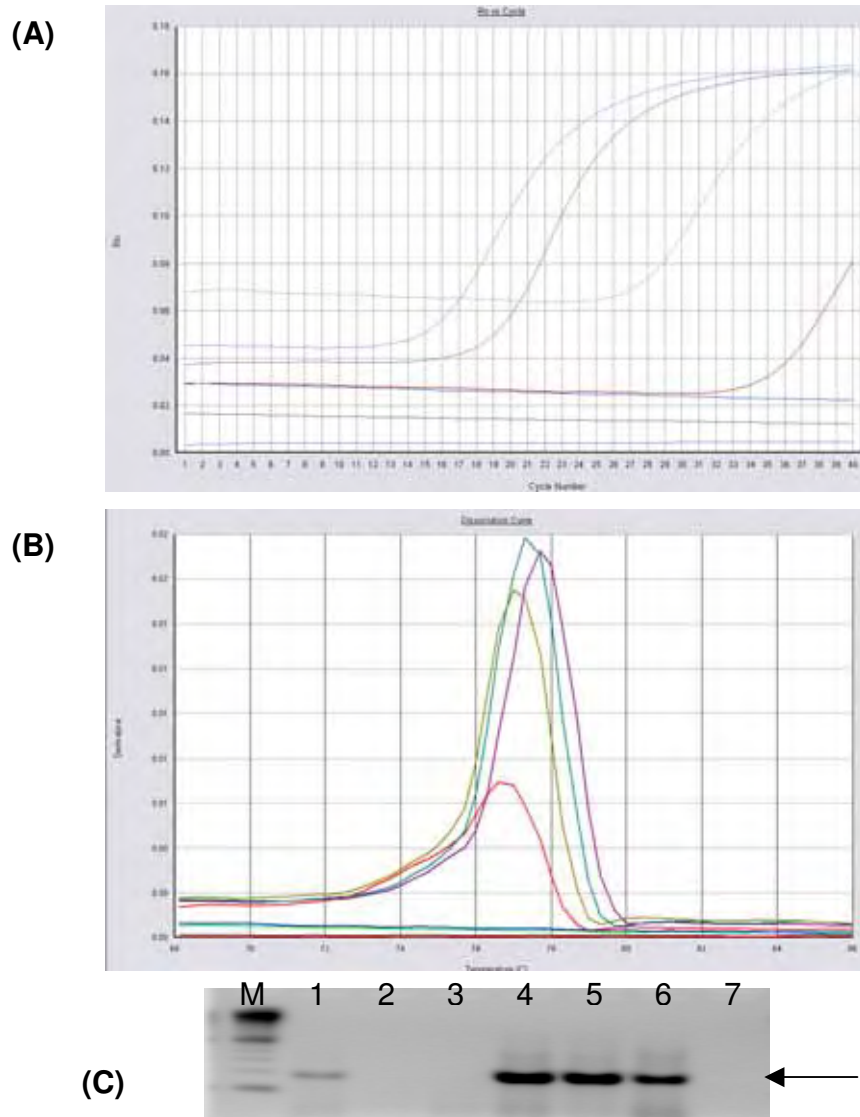


Figura 36. Detecção do VBI em aves experimentalmente vacinadas, com uso dos “primers” HV+/HV-. (A) Curvas de amplificação obtidas na rt RT-PCR. Linha vermelha – amostra colhida de pulmão no 3ºdpi. Linha azul – amostra colhida de traquéia no 3ºdpi. Linha verde escura – amostra colhida de traquéia no 5ºdpi. Linha verde claro – amostra colhida de traquéia no 12ºdpi. (B) Curvas de dissociação obtidas na rt RT-PCR. Linha vermelha – amostra colhida de pulmão no 3ºdpi. Linha verde - amostra colhida de traquéia no 3ºdpi. Linha roxa – amostra colhida de traquéia no 5ºdpi. Linha amarela – amostra colhida de traquéia no 12ºdpi. (C) Gel de agarose das amostras amplificadas por RT-PCR convencional. M – Marcador 100 bp Ladder, 1 a 3 – amostras colhidas de pulmão nos intervalos : 3, 5 e 12 dpi, 4 a 6- amostras colhidas de traquéia nos intervalos: 3, 5 e 12 dpi, 7 – Controle negativo.

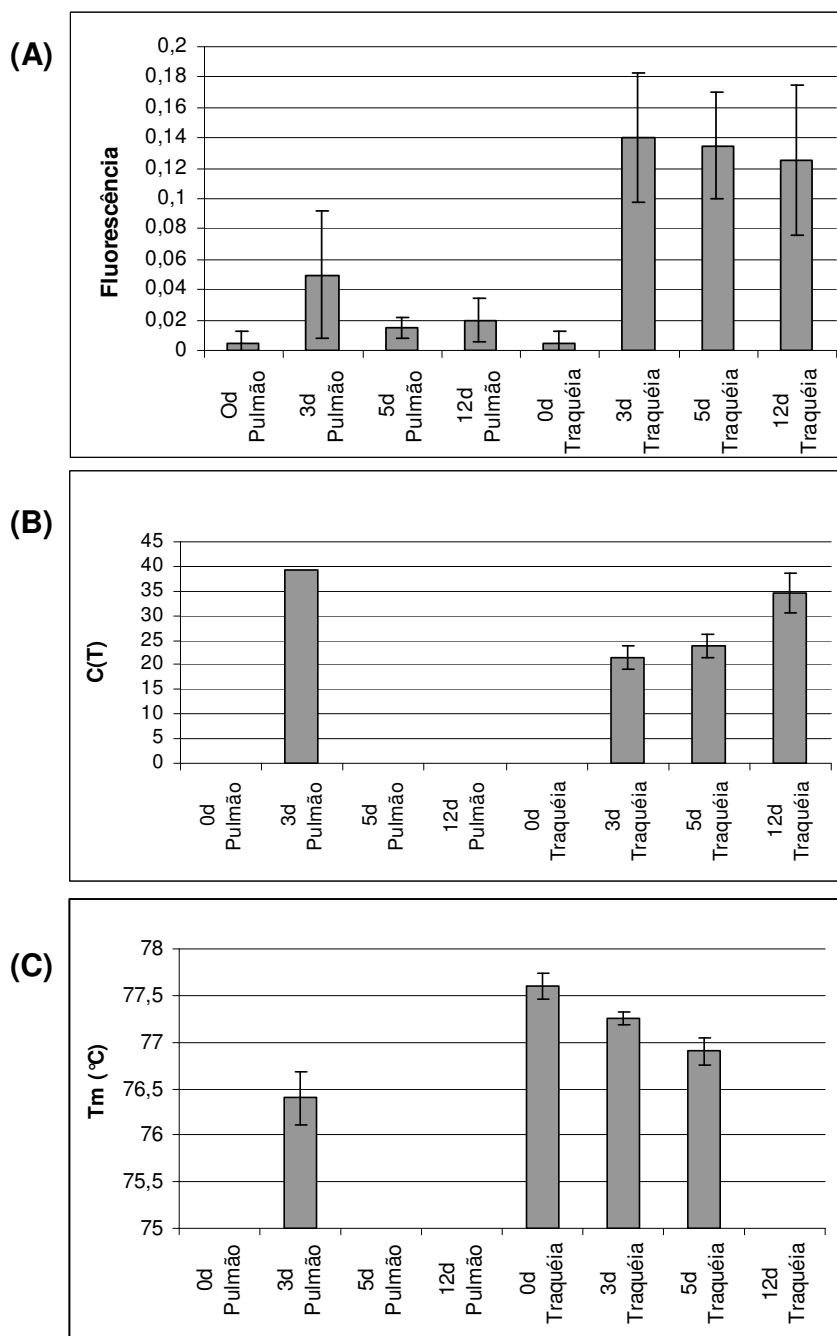


Figura 37. Detecção do VBI por rt RT-PCR com uso dos “primers” HV+/HV- em amostras de traquéia e de pulmão colhidas das aves infectadas com a estirpe H120 do VBI. (A) Valores de fluorescência obtidos em cada intervalo p.i. (B) Valores de C(T) obtidos em cada intervalo p.i. (C) Valores de Tm obtidos em cada intervalo p.i.

Tabela 10. Frequência de detecção do VBI através dos métodos de isolamento viral (IV)^a, RT-PCR convencional^b e RT-PCR em tempo real^c em amostras de traquéia e pulmão de aves vacinadas, nos diferentes dias pós-vacinação (dpv).

	Pulmão	Traquéia	Média
IV	1/3 (33,33%)	1/3 (33,33%)	1/3 (33,33%)
RT-PCR	1/3 (33,33%)	3/3 (100%)	2/3 (66,66%)
rt RT-PCR	1/3 (33,33%)	3/3 (100%)	2/3 (66,66%)

^a Amostras foram analisadas conforme a presença (+) ou ausência (-) de lesões de nanismo, enrolamento e/ou hemorragia, foram realizadas 3 passagens.

^b O método de detecção empregado foi a presença (+) ou ausência (-) de bandas visualizadas através da eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídeo.

^c As amostras que apresentaram crescimento exponencial na curva de amplificação e Tm específicas foram consideradas positivas (+), as demais foram consideradas negativas (-).

5.8. Comparação da detecção entre os testes de RT-PCR convencional e rt RT-PCR e o teste padrão de isolamento viral na detecção do VBI em amostras colhidas das aves infectadas experimentalmente com a estirpe M41

Em razão de as técnicas de RT-PCR convencional e RT-PCR em tempo real apresentarem mesma sensibilidade analítica, a análise estatística foi realizada entre a performance de detecção do gene S1 do VBI destas duas técnicas em relação ao método padrão ouro que é o isolamento viral em ovos embrionados SPF.

O teste de Qui-quadrado demonstrou que há diferença significativa entre os índices de detecção dos testes de biologia molecular (RT-PCR/rt RT-PCR) e os da técnica padrão de IV.

Os valores encontrados para a sensibilidade, especificidade e acurácia dos métodos de RT-PCR convencional e RT-PCR em tempo real em relação ao teste padrão de IV em ovos embrionados, foram de 100%, 25% e 67,90%, respectivamente. O grau de concordância Kappa foi de 0,28, que indica uma fraca concordância entre as técnicas, o que foi reflexo da sensibilidade máxima (100%) associada a uma baixa especificidade (25%), resultantes do elevado índice de detecção pelas técnicas de biologia molecular (89,29%) quando comparado à técnica padrão de IV (57,14%).

6 DISCUSSÃO

O aparecimento de novas variantes do VBI se constitui em um dos piores obstáculos para o controle eficiente da infecção por este patógeno (KING et al., 1988), devido à baixa proteção cruzada, que, via de regra, é conferida pelas vacinas em relação às novas variantes de campo, que constantemente estão surgindo em plantéis de aves comerciais (CAPUA et al., 1994; COOK, 1984; DAVELAAR, et al., 1984; GELB Jr, et al., 1991; JIA et al., 1995; KING et al., 1988). Assim, alterações relevantes na antigenicidade e virulência do VBI tem sido relatadas em diversos países (KING et al., 1988; WANG et al., 1996, 1997; DI FABIO et al., 2000); portanto a rápida detecção e identificação do VBI são imprescindíveis para que medidas mais eficazes de controle dessa doença infecciosa sejam tomadas.

A diversidade antigênica do coronavírus aviário e sua importância na epidemiologia da BIG desde há longo tempo têm sido reconhecidas, sendo que, primeiramente, foram descritas as diferenças antigênicas entre as estirpes Massachusetts e Connecticut do VBI (JUNGHERR et al., 1956). A variabilidade genética na subunidade S1 (gene S) representa, por sua vez, mecanismos de adaptação do vírus em relação a pressões imune-seletivas associadas à vacinação contra a BIG e outras práticas de manejo. Estes fenômenos resultaram na geração de mais de 20 sorotipos reconhecidos do vírus, além de serem os fatores preponderantes para o surgimento de novas variantes que continuam a se desenvolver e causar os processos infecciosos e a doença clínica. Ademais, um grande número de aves utilizadas na produção industrial avícola são rotineiramente vacinadas contra a BIG, com o uso da estirpe H120 na forma atenuada, isto é, com capacidade de replicação no organismo hospedeiro e como este vírus pertence ao sorotipo Massachusetts, passa a representar um problema adicional para a discriminação de estirpes de campo

virulentas desse sorotipo, quando se utiliza RT-PCR convencional, ou até mesmo a técnica de RFLP. Conseqüentemente, este fato torna ainda mais difícil o diagnóstico laboratorial do VBI em aves rotineiramente vacinadas contra a BIG, usando-se tais métodos de biologia molecular.

Em adição aos aspectos singulares das características biológicas do VBI acima explanados, deve-se entender de pronto que a variação genética consiste em um evento comum entre os isolados do VBI, fazendo com que o desenho de “primers” para a detecção de todos os isolados do VBI seja, em princípio, muito difícil. Uma outra dificuldade encontrada nesse caso é reunir em somente um procedimento de RT-PCR convencional, a detecção e identificação de um dado sorotipo ou estirpe do VBI (CAVANAGH et al., 1999).

Todavia, análises comparativas da seqüência do gene S1 do VBI têm revelado que existem poucas regiões conservadas flanqueando um grande número de regiões variáveis e até mesmo hipervariáveis (HRVs) deste gene (ADZHAR et al., 1996; KEELER et al., 1998; OKINO et al., 2005), permitindo assim, a construção de “primers” universais. Neste estudo foram utilizados dois pares de “primers” localizados em regiões conservadas desse mesmo gene (Figura 1), um deles flanqueando a região hipervariável 1 (HRV1), e que foi obtido através do trabalho descrito por WANG et al., 1996, e o outro par de primers foi desenhado de maneira a flanquear a região hipervariável 2 (HRV2). Ambos pares de primers amplificaram por RT-PCR todas as 17 estirpes do VBI testadas (Figura 2), incluindo aquelas dos sorotipos Massachusetts, Connecticut, Iowa, SE 17, JMK e também as estirpes isoladas de campo brasileiras que, de acordo com relatos de estudos de análises filogenéticas, constituem grupos gênicos distintos de quaisquer outros grupos isolados em outros países (MONTASSIER et al., 2006). Nesse sentido, sabe-se que apesar das dificuldades apresentadas há relatos em investigações similares anteriormente realizadas, destacando que foram desenhados e utilizados com sucesso “primers” universais para a amplificação do gene S1 do VBI por RT-PCR (KWON et al., 1993; ADZHAR et al., 1996; KEELER et al., 1998; OKINO et al., 2005).

Assim, de posse dos dois pares de primers acima referidos, foi possível também desenvolver as técnicas de rt RT-PCR e RT-PCR convencional utilizada neste estudo, o qual apresentou resultados similares em relação à amplificação pelos dois pares de oligonucleotídeos avaliados, tanto no que concerne à variedade de estirpes detectadas quanto aos resultados de especificidade e de sensibilidade, tendo sido observadas alta sensibilidade da reação e especificidade, já que nenhum outro vírus heterólogo testado apresentou produto amplificado detectável à visualização no gel de eletroforese.

No entanto, na técnica de RT-PCR em tempo real, foi observada a amplificação de produtos inespecíficos para amostras negativas, isto é, sem a presença do VBI, somente quando nessas reações foram utilizados os “primers” W+ / W- (Figuras 4 e 5). Portanto, para fins de diagnóstico do VBI, optou-se pelo uso da combinação de “primers” HV+ / HV-, e deixou-se a combinação de “primers” W+ / W- como recurso complementar para avaliação de variação de Tm e diferenciação de algumas estirpes do VBI, que porventura, não apresentassem Tm muito distintas com a utilização do par de “primers” HV+ e HV-.

As principais vantagens do método de rt RT-PCR sobre a técnica de RT-PCR convencional e/ou as técnicas de hibridização são a maior rapidez e o menor risco de contaminação das instalações do laboratório com DNA amplificado ou ainda maior segurança para os operadores ao evitar a manipulação de brometo de etídeo. Assim, a detecção de produtos de DNA amplificados pela técnica convencional de PCR requer que seja realizada a separação eletroforética dos fragmentos amplificados de DNA na presença de brometo de etídeo, seguindo-se a análise visual e densitométrica das bandas resultantes após irradiação por luz ultravioleta. Alternativamente, a detecção e a identificação pela método de Southern blot de amplicons, utilizando a hibridização com um oligonucleotídeo-sonda marcado também é procedimento demorado e necessita de diversos passos para a manipulação de produtos amplificados, aumentando o risco de se contaminar as instalações do laboratório com os produtos amplificados de DNA.

Além disso, se for considerada uma outra técnica de diagnóstico molecular, como o PCR-ELISA, serão encontradas, nesta metodologia, algumas outras dificuldades que se traduzirão em desvantagens, uma vez que há a necessidade de se fazer a captura

do amplicon obtido na PCR em uma fase sólida com a superfície das suas cavidades previamente revestida com estreptavidina e, utilizando-se, em seguida, um dos “primers” marcados com biotina e o outro com digoxigenina, (oligo-sonda), para que se possa fazer a revelação do produto amplificado e adsorvido à fase sólida por meio de anticorpos anti-digoxigenina marcada com enzima, em uma configuração de reação muito similar ao formato de ELISA. Dessa forma, esse último método torna-se mais demorado e oneroso, além de que podem surgir algumas dificuldades adicionais na marcação das oligo-sondas e na padronização dessa reação.

Em contraste com os procedimentos convencionais de PCR, uma grande vantagem da técnica de PCR em tempo real refere-se ao fato de que a detecção do amplicon pode ser visualizada e mensurada, passo a passo, de acordo com o progresso da reação de amplificação, o que elimina a necessidade de serem executadas etapas após a amplificação, trata-se de um “sistema fechado”, o que aumenta a rapidez dessa técnica, evita o manuseio de brometo de etílico, uma substância altamente carcinogênica e a contaminação do ambiente laboratorial com produtos amplificados. Outras vantagens relatadas são o aumento da velocidade de execução dessa reação, devido à redução do número de ciclos e ao aumento da sensibilidade (MACKAY et al. 2002).

Diversos tipos de marcadores têm sido descritos para a reação de PCR em tempo real, dentre eles encontram-se os que detectam seqüências específicas através do uso de sondas de hibridização marcadas com fluorocromos baseadas na transferência de energia ressonante fluorescente (TaqMan, Molecular Beacons, LightCycler e Amplifluor). Há, também, um outro formato que utiliza um marcador que se liga à dupla fita de DNA, o SYBR Green I, o qual tem a propriedade de se ligar a qualquer cadeia de dupla fita de DNA, independentemente da seqüência de nucleotídeos. Em nosso estudo, o marcador SYBR Green I foi o preferido, devido ao custo mais reduzido em relação aos demais e por tornar desnecessário a construção de sondas de hibridização, além de permitir a diferenciação de estirpes através da análise de variações da temperatura de dissociação (“Melting temperature” ou T_m) e com a utilização de um único par de oligonucleotídeos.

Assim como outros RNA vírus, as estirpes do VBI são conhecidas pela sua elevada propensão a sofrer diversas variações no genoma e mutações espontâneas aleatórias em seus genes mais importantes. Assim, se houver mutação ou variação na região onde se encontram “primers” ou sondas que se hibridizam a esta região, não haverá reação e um falso negativo seria encontrado. Através do uso de uma variedade de sondas esse problema poderia ser contornado. Entretanto, a síntese e purificação de sondas eficientes não são fáceis. Em contraste, o uso de SYBR Green I não necessita o uso de oligo-sondas, tem custo relativamente mais baixo, e já foi utilizado para detectar e diferenciar outros RNAvírus em diversos estudos anteriores (PHAM et al., 2005; CHUTINIMITKUL et al., 2005; VARGA & JAMES, 2006) assim como para a detecção de micoplasmas contaminantes em culturas de células (HARASAWA et al., 2005).

Ainda, em favor da utilização do SYBR Green I na técnica de RT-PCR em tempo real para a detecção e ou diferenciação de patógenos virais, foi relatada uma alta sensibilidade e especificidade da técnica de PCR em tempo real com uso do marcador SYBR Green I na detecção do vírus da doença de Gumboro, sendo esta reação no mínimo 10 vezes mais sensível do que a técnica de PCR ELISA (AINI et al., 2006). Em adição a isso, diversos outros trabalhos relataram a eficiência da técnica de rt RT-PCR na detecção de patógenos com a utilização do marcador SYBR Green I, tal como ocorreu com o estudo desenvolvido, para a detecção de “pancoronavírus” por ESCUTENAIRE et al. (2006), ou de norovírus em fezes humanas por RICHARDS et al. (2004), ou de rotavírus humano em fezes por MIN et al. (2006), ou de vírus da síndrome Taura, ou ainda, do vírus da cabeça amarela de camarão, por MOUILLESSEAUX et al. (2003).

A T_m deve ser entendida como a temperatura na qual a dupla fita de DNA desnatura e o marcador (SYBR Green I) se desliga, reduzindo abruptamente a fluorescência. Essa temperatura é facilmente determinada como máximo da primeira derivada negativa da curva de dissociação (KUBISTA et al. 2006). Nesse contexto, deve ser considerado que a elevação da T_m é influenciada basicamente por dois fatores principais: aumento da porcentagem de CG e/ou do tamanho do fragmento amplificado. Dessa forma, para melhor interpretar os resultados da aplicação da técnica

de RT-PCR em tempo real para a separação das estirpes do VBI em diferentes grupos genéticos, os valores de porcentagem de CG e tamanho dos fragmentos amplificados foram levantados com base em seqüências de nucleotídeos de algumas estirpes de referência cadastradas no GenBank que foram utilizadas neste estudo.

Embora a análise das Tms obtidas a partir da dissociação de produtos amplificados na rt RT-PCR não possua a capacidade de detalhar as mínimas diferenças encontradas entre seqüências de nucleotídeos de uma determinada região gênica de diferentes estirpes do VBI, ou até mesmo formar uma árvore filogenética, tal qual consegue fazer a análise por sequenciamento, esta metodologia se constitui em uma forma de triagem para diferenciação de estirpes do VBI em genogrupos, possibilitando a construção de grupos por semelhança nas temperaturas de dissociação dos produtos de uma dada região do gene S1, de maneira muito mais simples e rápida que o sequenciamento, e ainda com menor custo.

No presente estudo, a reação de PCR em tempo real utilizando SYBR Green I, com um único par de “primers”, também foi eficaz na detecção e diferenciação de estirpes de VBI de diversos sorotipos (Tabelas 4 e 5). A partir da análise estatística pelo teste de Scott-Knott (1974) foram obtidos quatro grupos contendo estirpes que apresentaram similaridade de Tm a partir da rt RT-PCR com uso dos “primers” W+/W- (Tabela 6), e outros quatro grupos contendo estirpes que apresentaram similaridade de Tm a partir da rt RT-PCR com uso dos “primers” HV+/HV- (Tabela 7), sendo que algumas dessas estirpes que não foram discriminadas com base em Tms dos produtos amplificados com o par de “primers” HV+/HV-, conseguiram ser diferenciadas quando foram analisadas as Tms dos amplicons gerados pelos “primers” W+/W-.

Recentemente, a presença de um número significativo de estirpes isoladas de campo do VBI, diferindo através de análises filogenéticas de outras estirpes de genotipos/sorotipos com base no gene codificador têm sido encontradas em circulação em granjas avícolas comerciais brasileiras (MONTASSIER et al., 2006, VILLAREAL et al., 2006). Como pôde ser observado nas Figuras 15 e 17, as estirpes isoladas de campo brasileiras do VBI cadastradas no GenBank formam um grupo distante

filogeneticamente de diversas outras estirpes do VBI, inclusive de estirpes vacinais atualmente em uso na avicultura brasileira (H120, H52 e Ma5).

No trabalho descrito por MONTASSIER et al. (2006) foi realizado o sequenciamento de fragmentos da extremidade 5' do gene S1 do VBI de 12 estirpes de campo brasileiras, dentre as quais oito foram utilizados neste estudo. Assim, pode ser observada similaridade entre a genotipagem no mesmo grupo das estirpes VBISC02 e Connecticut que foram observadas, tanto no trabalho descrito por MONTASSIER et al. (2006), como através da análise de Tms dos fragmentos obtidos através da amplificação pelos "primers" W+/W- e HV+/HV- (Tabelas 6 e 7). Relação similar entre os achados de sequenciamento da extremidade 5' do gene S1 (MONTASSIER et al., 2006) e o agrupamento de estirpes brasileiras de campo foram também encontradas para a genotipagem feita pela técnica de rt RT-PCR para as estirpes, VBISC01, VBIPR03, VBIPR07 e VBISP02 em relação às estirpes de referência vacinais H120 e Ma5, bem como para estirpes VBIPR01, VBIPR02, VBIPR05 e VBIPR06, sendo que a reunião desses vírus em tal tipo de agrupamento é reforçada pelos dados da análise filogenética, quando foram incluídas outras estirpes isoladas no Brasil em período mais recente, mas que não foram analisadas nesta investigação, tais como USP01, USP02, USP3, USP04, USP05, USP06, USP07, USP08, USP09, USP10, USP11 e USP12.

Ao se avaliar comparativamente os resultados de Tm obtidos a partir da dissociação dos produtos oriundos da rt RT-PCR com os "primers" W+/W- e HV+/HV- com o alinhamento realizado com base em seqüências gênicas de diferentes estirpes do VBI que se encontram cadastradas no GenBank, pode ser também observada uma boa concordância dos resultados. Nas Figuras 15 e 17 estão dispostas árvores filogenéticas referentes a fragmentos amplificados a partir do uso dos "primers" W+/W- e HV+/HV- de estirpes do VBI cadastradas no GenBank, respectivamente, sendo que as estirpes vacinais (H120, Ma5 e H52) estão mais intimamente relacionadas, ficando um pouco mais distante da estirpe M41, e ainda mais da estirpe Connecticut, e havendo, em adição a isso, a configuração de um outro grupo genético distinto que é constituído pelas estirpes JMK e SE 17.

Dessa forma, observando-se a disposição das estirpes do VBI nos grupos formados através da análise estatística das Tms obtidas a partir da dissociação dos produtos amplificados por rt RT-PCR com uso dos “primers” W+/W- e HV+/HV- (Tabelas 6 e 7), na qual as estirpes JMK e SE 17 formam um grupo a parte quando avaliadas as Tms obtidas dos produtos amplificados por ambos pares de “primers”. As estirpes vacinais (H52, H120 e Ma5) encontram-se agrupadas em um mesmo grupo quando foram avaliadas as Tms referentes aos produtos amplificados com o uso dos “primers” HV+/HV-, ou em grupos próximos no caso das Tms referentes aos produtos amplificados obtidos com o uso dos “primers” W+/W-. A estirpe Connecticut pode ser diferenciada das demais estirpes de referência quando analisada a Tm obtida a partir da amplificação com uso dos “primers” W+/W-, onde foi obtido o menor valor de Tm. Já a estirpe M41 pode ser diferenciada ao se analisar as Tms obtidas dos amplicons gerados a partir da amplificação por ambos pares de “primers”. Pode-se concluir, dessa maneira, que os resultados obtidos através desta técnica foram, no geral, compatíveis com os dados gerados a partir de análises filogenéticas com base no seqüenciamento de nucleotídeos das duas regiões gênicas de S1 que foram alvos de amplificação neste estudo.

JACKWOOD et al. (2003) descreveram a detecção e diferenciação de estirpes do VBI através da técnica de PCR em tempo real com a utilização de transferência de energia ressonante fluorescente (FRET), por meio de oligo-sondas específicas marcadas, tendo sido observada a presença de dois picos de Melting durante a curva de dissociação, que foi interpretada por esses autores como indicativa da presença de duas populações ou “quasispecies” na amostra da estirpe Beaudette do VBI. Em nosso trabalho, durante a curva de dissociação da estirpe VBIPR05, foram também obtidos dois picos de Melting, indicando possivelmente a presença de “quasispecies” na amostra desse isolado viral, tal qual havia sido descrito por JACKWOOD et al. (2003).

CALLISON et al. (2005) descreveram a diferenciação entre isolados do VBI através da clivagem do RNA alvo por RNase H mediada por oligonucleotídeos quiméricos de seqüência específica seguida pela quantificação da taxa residual das amostras (SRRQ) utilizando rt RT-PCR, que foi capaz de diferenciar isolados dos

sorotipos Massachusetts, Connecticut, Arkansas e Delaware/Geórgia 88. No entanto, diferentes oligonucleotídeos foram utilizados para se fazer esse tipo de diferenciação. Alternativamente, uma vantagem observada no presente estudo é o menor custo da metodologia aqui desenvolvida, além de permitir a diferenciação em genótipos entre estirpes, utilizando-se apenas um único par de “primers”.

Embora a prevenção da infecção pelo VBI dependa primariamente do uso de vacinas vivas atenuadas, a doença é de difícil controle devido a existência e/ou surgimento de novas variantes que se expressam como diferentes sorotipos ou patótipos desse mesmo vírus, os quais, via de regra, não possuem proteção cruzada. Ainda, deve-se considerar que a infecção causada pelo VBI pode-se manifestar clinicamente de forma similar a outras doenças infecciosas, como laringotraqueíte, influenza aviária e doença de Newcastle viscerotrópica velogênica. Portanto, é importante ter em mãos um método de detecção e identificação mais rápido e preciso do VBI, tal como se configuram os métodos de RT-PCR convencional ou de tempo real.

Os métodos atuais de diagnóstico do VBI incluem isolamento viral em ovos embrionados, cultura em anéis traqueais, imunoenaios e testes moleculares para detecção de RNA viral (CALLISON et al., 2006). O isolamento viral, por seu turno, é considerado como teste de referência, entretanto, possui custo elevado e é muito demorado, devido à necessidade de várias passagens em ovos embrionados para detecção de algumas estirpes deste vírus. Ademais, há um outro problema a ser considerado, neste caso, é a possibilidade de serem encontradas lesões embrionárias semelhantes de nanismo e enrolamento em ovos inoculados com uma estirpe de Newcastle (CAVANAGH & NAQI; 2003). Os imunoenaios, apesar de mais rápidos e simples em relação ao isolamento viral, podem apresentar inespecificidade e/ou baixa sensibilidade e não detectam todas as estirpes do VBI (CALLISON et al., 2006).

Testes moleculares para a detecção do VBI têm sido utilizados com frequência cada vez maior, devido à sua alta sensibilidade, rapidez e especificidade. O uso da RT-PCR para amplificar o gene codificador da glicoproteína S do VBI pode ser complementado com as técnicas de RFLP (“Restriction fragment length polymorphism”)

ou sequenciamento a fim de se identificar o genótipo do VBI (CAVANAGH et al., 1990; KELLER et al., 1998; CALLISON et al., 2006).

No entanto, neste estudo foi desenvolvida e aplicada, de forma bem sucedida, a rt RT-PCR através do uso de um único par de “primers” na a detecção do VBI, que possibilitou a discriminação desse vírus com relação a três outros RNA vírus aviários (vírus da doença de Newcastle, vírus da doença de Gumboro e pneumovírus) e, ainda, viabilizou, por meio da determinação da T_m , um novo método de diferenciação preliminar entre estirpes e/ou isolados de campo do VBI. Assim, pode-se considerar para o diagnóstico laboratorial do VBI que a rt RT-PCR é um método com alta sensibilidade e especificidade e, ainda, de baixo custo quando comparado a outros procedimentos de diagnóstico molecular e mesmo em relação à técnica padrão de isolamento viral em ovos embrionados SPF de galinha e, dessa forma, reveste-se de um grande potencial de aplicação.

Os resultados dos testes de sensibilidade analítica demonstraram elevada sensibilidade de detecção, sendo obtidos resultados positivos, para ambas as técnicas de rt RT-PCR e RT-PCR convencional, os limites de detecção foram as diluições de 10^{-5} do LCA infectado com a estirpe M41 (Figura 18), de 10^{-8} do cDNA da estirpe M41 (Figura 20) e de 10^{-9} do DNA plasmideal da estirpe M41 (Figura 22), equivalente a $1,32 \times 10^2$ cópias de DNA, sendo este limite de detecção semelhante ao encontrado por PHAM et al. (2005), de 9×10^2 cópias de DNA plasmideal do gene F do vírus da doença de Newcastle.

A adição do DTT durante a reação de transcrição reversa não foi empregada no protocolo adotado pois verificou-se que esse reagente interfere somente negativamente na rt RT-PCR, como pode ser observado na Figura 3. Tais resultados foram igualmente encontrados por DEPREZ et al. (2002), VARGA & JAMES (2005) e AINI et al. (2006), que destacaram ser a omissão de DTT durante a síntese de cDNA um fator crucial para que sejam alcançados bons resultados na técnica de PCR em tempo real, pois esta operação acarreta diminuição do valor de C(T) e promove um aumento das curvas de amplificação, bem como a remoção de “ruídos” da reação (“fluorescência de background”).

Em relação aos resultados obtidos na detecção do VBI em aves experimentalmente infectadas com a estirpe M41, foi demonstrada a presença do VBI do 2ºdpi ao 9ºdpi (57,14% das aves inoculadas com VBI) através da técnica de isolamento viral em ovos embrionados a partir de ambas amostras de traquéia e pulmão; do 1ºdpi ao 20ºdpi (100% das aves inoculadas com VBI) e do 2ºdpi ao 15ºdpi (78,57% das aves inoculadas com VBI) através das duas técnicas de RT-PCR a partir de amostras de traquéia e pulmão, respectivamente. A detecção do VBI em amostras de traquéia por PCR em tempo real foi cerca de 43% maior do que técnica de isolamento viral em ovos embrionados.

A técnica de IV foi eficiente na detecção do VBI presente nas amostras de traquéia e pulmão infectadas com a estirpe M41 do VBI. O vírus foi recuperado do segundo ao nono dia pós-infecção. Os resultados foram compatíveis com os encontrados por OWEN et al. (1991), que detectaram a estirpe H52 do VBI, através do IV em amostras de traquéia no terceiro, quinto, sétimo e décimo dias pós-infecção. Resultados similares também foram descritos por BRONZONI (1999), no desenvolvimento de um estudo de infecção experimental com a estirpe M41 do VBI, no qual as aves foram infectadas aos 14 dias de idade com um título infectante de $10^{6,7}$ DIE_{50}/mL , sendo que o VBI foi isolado entre o terceiro e o décimo dias pós-infecção, em amostras de traquéia e pulmão. LUCIO & FABRICANT (1990) realizaram um estudo sobre o tropismo de três isolados cloacais do VBI em relação a amostra M41, obtendo resultados do IV da estirpe M41 em amostras de traquéia e pulmão que também são coincidentes com os resultados obtidos neste estudo, com IV até o nono dia pós-infecção. BHATTACHARJEE et al. (1994) utilizando o método de cultura de órgão traqueal (TOC), em diferentes concentrações de VBI inoculadas, concluíram que quanto maior a dose infectante na infecção experimental, mais precocemente o VBI pode ser detectado. Com uma dose infectante de $10^{4,5}$ foi possível detectar ciliostase nos anéis traqueais entre 6 e 24 horas pós-infecção.

O desenho experimental deste estudo objetivou a detecção do VBI durante a fase aguda da infecção (ou seja, nos primeiros sete dias pós-infecção), estendendo-se até os vinte dias pós-infecção. Por esta razão, este trabalho deteve-se nas amostras de

tecidos dos tratos respiratório superior (traquéia) e inferior (pulmão), por serem locais onde o VBI replica-se inicialmente, antes de disseminar-se para outros órgãos pelos quais possui tropismo. Isto já foi constatado por HOFSTAD & YODER, Jr (1996) em um estudo no qual, após a infecção em aves com diferentes estirpes do VBI, o vírus foi isolado de amostras de traquéia e pulmões no período entre 24 horas e oito dias pós-infecção.

LUCIANO (2002) descreveu a detecção do VBI em aves experimentalmente infectadas através do uso das técnicas de RT-PCR e Nested-RT-PCR para amplificação de fragmentos do gene N comparando-as com a detecção através da técnica padrão de IV, onde pôde ser observada uma detecção mais efetiva em amostras de pulmão de aves experimentalmente infectadas em relação às amostras de traquéia, diferindo dos resultados obtidos neste estudo. No trabalho desse autor, as amostras de traquéia foram maceradas, enquanto aqui foi obtido um raspado a partir da superfície mucosa interna da traquéia; este procedimento aumentou tanto a quantidade de material como a área da superfície traqueal analisada, o que provavelmente permitiu uma maior detecção em amostras de traquéia.

HANDBERG et al. (1999) também encontraram uma maior sensibilidade de detecção do VBI a partir de amostras de traquéia de aves infectadas experimentalmente por RT-PCR convencional em relação à técnica de imunohistoquímica, no entanto, o objetivo era a detecção de diferentes estirpes do VBI através de um único par de “primers” para a amplificação de uma região referente ao gene N, enquanto outros quatro pares de “primers” referentes ao gene S1 foram utilizados com o intuito de fazer a diferenciação entre estirpes desse vírus. Ao contrário, neste estudo pôde ser realizada a detecção e a diferenciação entre estirpes através de um único par de “primers” específicos para a região 5´terminal do gene S1.

Durante a fase crônica ou de convalescença da BI, os sinais clínicos tendem a se tornar mais brandos até desaparecerem, contudo, a ave continua portadora do vírus e constitui importante fonte de eliminação desse vírus. Nessa fase, a quantidade de vírus existente no trato respiratório reduz-se, gradativamente, sendo, então, necessário, para o sucesso no diagnóstico direto do VBI, a aplicação de um método de elevada

sensibilidade. Nesse contexto, verificou-se que as técnicas de RT-PCR convencional e de rt RT-PCR desenvolvidas e aplicadas neste experimento demonstraram alta sensibilidade quando comparadas com o procedimento de referência para o diagnóstico laboratorial do VBI, que é a técnica de isolamento viral em ovos embrionados de galinha.

A propósito da avaliação do desempenho da técnica de RT-PCR em tempo real, foi verificado no trabalho descrito por CALLISON et al. (2006) um índice de 79,04% de detecção do VBI pela técnica de PCR em tempo real com a utilização do sistema de sonda Taqman, e de 27,51% pelo método convencional de isolamento viral em ovos embrionados SPF, quando foram usadas amostras de suabes traqueais. Neste estudo, os resultados revelaram 85,29% de positividade para amostras provenientes das aves infectadas experimentalmente pela técnica de rt RT-PCR e de 50% para a técnica padrão de IV.

Portanto, as técnicas de RT-PCR convencional e em tempo real apresentaram maior sensibilidade na detecção do VBI em relação à técnica de isolamento viral em ovos embrionados SPF, sendo que a detecção molecular a partir de amostras de traquéia apresentou uma maior sensibilidade quando comparada com as amostras de pulmão.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

1. A diferenciação entre estirpes pode ser realizada com o uso de outras técnicas, como RFLP, Souther Blot, PCR-ELISA, no entanto tais técnicas são mais complexas e demoradas em relação à técnica de rt RT-PCR, e, necessitam da manipulação de amplicons, o que aumenta o risco de contaminação do laboratório.
2. A diferenciação entre estirpes do VBI pôde ser realizada com sucesso neste estudo por meio da utilização de um único par de oligonucleotídeos através da técnica de RT-PCR em tempo real e com o emprego do marcador SYBR Green I.
3. Não há, na literatura compulsada, descrição da padronização da rt RT-PCR com a utilização do marcador SYBR Green I para a diferenciação entre estirpes do VBI.
4. O trabalho descrito por ESCUTENAIRE et al. (2006) padronizando a técnica de rt-RT-PCR para ser aplicada na detecção do VBI e de outros coronavírus com o uso do marcador SYBR Green I, tomou como alvo para a construção de primers uma região do gene da polimerase e, portanto não conseguiu fazer a diferenciação de estirpes do VBI em grupos genéticos distintos.
5. Existem trabalhos versando a padronização da técnica de rt RT-PCR para a detecção e diferenciação de estirpes do VBI, no entanto foram utilizadas sondas de hibridização e não o marcador SYBR Green I, o qual apresenta menor custo e maior praticidade.
6. A BI pode se manifestar clinicamente de forma semelhante a outras doenças infecciosas que acometem o trato respiratório de galinhas, tais como a larigotraqueíte infecciosa aviária, a influenza aviária e a doença de Newcastle, portanto é importante se ter em mãos uma forma de detecção e identificação rápida e precisa do VBI.

8 CONCLUSÕES

- As técnicas de RT-PCR convencional e de RT-PCR em Tempo Real, que foram desenvolvidas e aplicadas neste estudo, possuem alta sensibilidade e especificidade analítica na detecção do VBI presente em amostras de fluidos biológicos infectados ou de tecidos colhidos de amostras teciduais colhidas de aves infectadas experimentalmente.

- A técnica de RT-PCR em Tempo Real, desenvolvida e aplicada, neste estudo, foi, por meio da determinação da temperatura de dissociação (T_m), capaz de diferenciar em grupos distintos de genótipos, tanto as estirpes de referência, como as de campo do VBI que foram testadas.

- As técnicas de RT-PCR convencional e de RT-PCR em Tempo Real, que foram desenvolvidas e aplicadas, neste estudo, fizeram a detecção específica do VBI, tanto na fase aguda, como na de convalescença da infecção experimental por este vírus, principalmente no que concerne às amostras de traquéia.

- A sensibilidade das técnicas de RT-PCR convencional e de PCR em Tempo Real foi maior do que aquela apresentada pelo método de referência para ser usado no diagnóstico laboratorial desse patógeno viral, que é a técnica de isolamento viral em ovos embrionados de galinha.

9 REFERÊNCIAS

ADZHAR, A.; SHAW, K.; BRITTON, P.; CAVANAGH, D. Universal oligonucleotides for the detection of infectious bronchitis virus by polymerase chain reaction. **Avian Pathol.**, Cambs, v.25, p.817-836, 1996.

AINI, H. H.; OMAR, A. R.; HAIR-BEJO, M.; AINI, I. Comparison of Sybr Green I, ELISA and conventional agarose gel-based PCR in the detection of infectious bursal disease virus. **Microbiol. Res.**, Jena, In press, 2006.

ASSAYAG, M. S. Bronquite infecciosa das galinhas. In: SIMPÓSIO BRASIL SUL DE AVICULTURA 5., 2004, Chapecó, SC. **Anais ...** Chapecó: 2004. p.43-46.

BHATTARCHARJEE, P. S.; NAYLOR, C. J.; JONES, R. C. A simple method for immunofluorescence staining of tracheal organ cultures for the rapid identification of infectious bronchitis virus. **Avian Pathol.**, Cambs, v.23, n.1, p.471-480, 1994.

BOURSNELL, M. E. G. et al. Completion of the sequences of the genome of the coronavirus avian infectious bronchitis virus. **J. Gen. Virol.**, Reading, v.68, n.1, p.57-77, 1987.

BRONZONI, R. V. M. **Desenvolvimento e aplicação de ensaios imunoenzimáticos (Competitivo-ELISA, Duplo Anticorpo-ELISA e Sandwich-ELISA-Concanavalina A) para a detecção do vírus da bronquite infecciosa em tecidos de aves experimentalmente infectadas.** Jaboticabal, 1999, 68p. Dissertação de mestrado –

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias do Campus de Jaboticabal – UNESP, Jaboticabal, 1999.

CALLISON, S. A.; HILT, D. A.; JACKWOOD, M. W. Rapid differentiation of avian infectious bronchitis virus isolates by sample to residual quantitation using real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. **J. Virol. Methods**, Amsterdam, v.124, p.183-190, 2005.

CALLISON, S. A. et al. Development and evaluation of a real-time Taqman RT-PCR assay for the detection of infectious bronchitis virus from infected chickens. **J. Virol Methods**, Amsterdam, In press, 2006.

CAPUA, I. et al. A novel infectious bronchitis strain infecting broiler chickens in Italy. **J. Vet. Med. B.**, v.41, p.83-89, 1994.

CAPUA, I. et al. Co-circulation of four types of infectious bronchitis virus (793/B, 624/I, B1648 and Massachusetts). **Avian Pathol.**, Cambs, v.28, n.5, p.587-92, 1999.

CAVANAGH, D. Strutral polypeptides of coronavirus IBV. **J. Gen. Virol.**, Reading, v.53, n.1, p.93-103, 1981.

CAVANAGH, D. Advances in avian diagnostic technology. In: WORLD VETERINARY POULTRY ASSOCIATION CONGRESS 10., 1993, Sidney. **Proccedings...**p.57-70.

CAVANAGH, D. The coronavirus surface glycoprotein. In: SIDELL, S. G. **The coronaviridae**. New York: Plenum Press, 1995, p.73-113.

CAVANAGH, D.; NAQI, S. Infectious Bronchitis. In : BARNES, H.J. et al. **Diseases of poultry**. 11. ed. Ames: Iowa State University Press, 2003. p.101-119.

CAVANAGH, D. et al. Revision of the taxonomy of Coronavirus, Torovirus and Arterivirus genera. **Arch. Virol.**, Vienna, v.135, n.1, p.227-237, 1994.

CAVANAGH, D.; MAWDITT, K.; BRITTON, P.; NAYLOR, C. J. Longitudinal field studies of infectious bronchitis virus and avian pneumovirus in broilers using type-specific polymerase chain reactions. **Avian Pathol.**, Cambs, v.28, p.593-605, 1999.

CHUTINIMITKUL, S. et al. Dengue typing assay based on real-time PCR using SYBR Green I. **J. Virol. Methods**, Amsterdam, v.129, n.1, p.8-15, 2005.

COLLISSON, E. W., et al. Detection of avian infectious bronchitis using in situ hybridization and recombinant DNA. **Vet. Microbiol.**, Amsterdam, v.24, n.3, p.261-271, 1990.

COOK, J. K. H.; DARBYSHIRE, J. H.; PETERS, R. W. The use of chicken tracheal organ cultures for isolation and assay of avian bronchitis. **Arch. Virol.**, Vienna, v.50, n.1, p.109-118, 1976.

COOK, J. K. A. The classification of new serotypes of infectious bronchitis virus isolated from poultry flocks in Britain between 1981 and 1983. **Avian Pathol.**, Cambs, v.13, p.733-741, 1984.

DAVELAAR, F. G.; KOUWENHOVER, B.; BURGER, A. G. Occurrence and significance of infectious bronchitis variant strain in egg and broiler production in the Netherlands. **Vet Q.**, v.6, p.114-120, 1984.

DEPREZ, R. H. et al. Sensitivity and accuracy of quantitative real-time polymerase chain reaction using SYBR green I depends on cDNA synthesis conditions. **Analyt. Biochem.**, Duluth, v.307, n.1, p.63-69, 2002.

DHINAKAR, R. G.; JONES, R. C. Immunopathogenesis of infection in SPF chickens and commercial broiler chickens of variant infectious bronchitis virus of economic importance. **Avian Pathol.**, Cambs, v.25, n.3, p.481-501, 1996.

DHINAKAR, R. G.; JONES, R. C. Infectious bronchitis virus: immunopathogenesis of infection in chickens. **Avian Pathol.**, Cambs, v.26, n.4, p.677-706, 1997.

DI FÁBIO, J. Bronquite infecciosa das galinhas: aspectos clínicos e controle da BIG no Brasil. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 1993, Santos, SP. **Anais ...** Campinas : FACTA, 1993, p.1-8.

DI FÁBIO, J.; ROSSINI, L. I. Bronquite infecciosa das galinhas. In: BERCHIERI JR. A.; MACARI, M. **Doença das aves**. 1 Ed. Campinas: FACTA, 2000. p.293-300.

ESCUTENAIRE, S. et al. SYBR Green real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay for the generic detection of coronaviruses. **Arch. Virol.**, Vienna, In press, 2006.

FALCONE, E. et al. Rapid diagnosis of avian infectious bronchitis virus by the polymerase chain reaction. **J. Virol. Methods**, Amsterdam, v.64, n.2, p.125-130, 1997.

GELB, Jr, J. Infectious bronchitis. In: PURCHASE, H.G. et al. **A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens**, 3. ed. Kennett Square: American Association of Avian Pathologists, 1989, p.124-127.

GELB Jr, J.; WOLFF, J. B.; MORAN, C. A. Variant serotypes of Infectious Bronchitis Virus isolated from commercial layer and broiler chickens. **Avian Dis.**, Kennet Square, v.35, n.1, p.82-87, 1991.

GORBALENYA, A. E. et al. *Nidovirales*: evolving the largest RNA virus genome. **Virus Res.**, Amsterdam, v.117, n.1, p.17-37, 2006

GUT, M. et al. One-tube fluorogenic reverse transcription-polymerase chain reaction for the quantitation of feline coronaviruses. **J. Virol. Methods**, Amsterdam, v.77, n.1, p.37-46, 1999.

HANDBERG, K. J. et al. Detection and strain Differentiation of infectious bronchitis virus in tracheal tissues from experimentally infected chickens by reverse transcription-polymerase chain reaction. Comparison with a immunohistochemical technique. **Avian Pathol.**, Cambs, v.28, n.4, p.327-335, 1999.

HARASAWA, R. et al. Rapid detection and differentiation of the major mycoplasma contaminants in cell cultures using real-time PCR with SYBR Green I and melting curve analysis. **Microbiol. Immunol.**, Tokio, v.49, n.9, p.859-863, 2005.

HIPÓLITO, O. Isolamento e identificação do vírus da bronquite infecciosa das galinhas no Brasil. **Arq. Esc. Sup. Vet. MG**, Belo Horizonte, v.10, p.131-63, 1957.

HIPÓLITO, O.; BOTTINO, J. A.; PINTO, A. A. Estudos de duas amostras de vírus isoladas de casos da "síndrome nefrite-nefroze" das galinhas no Brasil. **Ciênc. Cult.**, São Paulo, v.25, p.569, 1973.

HOFSTAD, M. S.; YODER Jr, H. W. Avian infectious bronchitis virus – virus distribution in tissues of chicks. **Avian Dis.**, Kennet Square, v.10, p.230-239, 1966.

HOPKINS, S. R. Serological comparisons of strains of infectious bronchitis virus using plaque purified isolants. **Avian Dis.**, Kennet Square, v.18, n.2, p.231-239, 1974.

IGNJATOVIC, J; ASHTON, F. Detection and differentiation of avian infectious bronchitis viruses using antibody-based ELISA. **Avian Pathol.**, Cambs, v.25, p.721-736, 1996.

IGNJATOVIC, J.; GALLI, L. The glycoprotein but not the N or M proteins of avian infectious bronchitis virus induces protection in vaccinated chickens. **Arch. Virol.**, Vienna, v.138, n.1, p.117-134, 1994.

JACKWOOD, M. W.; KWON, H. M.; HILT, D. A. Infectious bronchitis virus detection in allantoic fluid using the polymerase chain reaction and a DNA probe. **Avian Dis.**, Kennett Square, v.36, n.2, p.403-409, 1992.

JACKWOOD, M. W.; YOUSEF, N. M. H.; HILT, D. Further development and use of a molecular serotype identification test for infectious bronchitis virus. **Avian dis.**, Kennet Square, v.41, n.1, p.105-110, 1997.

JACKWOOD, M. W.; HILT, D. A.; CALLISON, S. A. Detection of infectious bronchitis virus by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction and identification of a quasispecies in the Beaudette Strain. **Avian dis.**, Kennet Square, v.47, n.3, p.718-724, 2003.

JIA, W. et al. A novel variant of avian infectious bronchitis virus resulting from recombination among three different strains. **Arch. Virol.**, Vienna, v.140, n.2, p.259-271, 1995.

JUNGHERR, E. L. et al. Immunological differences in strains of infectious bronchitis virus. **Proceedings of the 60th U.S Livestock Sanitary Association**, p.203-209, 1956.

KANT, A. et al. Location of antigenic sites defined by neutralizing monoclonal antibodies on the S1 avian infectious bronchitis virus glycopolyptide. **J. Gen. Virol.**, Reading, v.73, n.3, p.591-596, 1992.

KEELER, C. L. et al. Serotype identification of avian infectious bronchitis virus by RT-PCR of the peplomer (S-1) gene. **Avian Dis.**, Kennett Square, v.42, n.2, p.275-84, 1998.

KING, D. J. Identification of recent infectious bronchitis virus isolates that are serologically different from current vaccine strains. **Avian Dis.**, Kennet Square, v.32, p.362-364, 1988.

KUBISTA, M. et al. Review: The real-time polymerase chain reaction. **Mol. Asp. Med.**, Elmsford, v.27, p.95-125, 2006.

KUSTERS, J. G. et al. Sequence evidence for RNA recombination in fields isolates of avian coronavirus infectious bronchitis virus. **Vaccine**, London, v.8, n.6, p.605-608, 1990.

KWON, H. M.; JACKWOOD, M. W.; GELB Jr, J. Differentiation of infectious bronchitis virus serotypes using polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. **Avian Dis.**, Kennet Square, v.37, n.1, p.194-202, 1993.

LAI, M. M. C.; CAVANAGH, D. The molecular biology of coronaviruses. **Adv. Virus Res.**, San Diego, v.48, n.1, p.1-77, 1997.

LEUTENEGGER, C. M. et al. Rapid feline immunodeficiency virus provirus quantitation by polymerase chain reaction using the Taqman fluorogenic real-time detection system. **J. Virol. Methods**, Amsterdam, v.78, n.2, p.105-116, 1999.

LUCIANO, R. L. **Desenvolvimento da técnica de RT-PCR-ELISA para a detecção do vírus da bronquite infecciosa das aves (VBI)**. Jaboticabal, 2002, 68 p. Dissertação de mestrado – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias do Campus de Jaboticabal – UNESP, Jaboticabal, 2002.

LUCIO, B.; FABRICANT, J. Tissue tropism of three cloacal isolates and Massachusetts strain of infectious bronchitis virus. **Avian Dis.**, Kennet Square, v.34, p.865-870, 1990.

MACKAY, I. M.; ARDEN, K. E.; NITSCHKE, A. Survey and summary: Real-time PCR in virology. **Nucleic Acids Res.**, Oxon, v.30, n.6, p.1292-1305, 2002.

MIN, B. S. et al. Assesment of the quantitative real-time polymerase chain reaction using a cDNA standard for human group A rotavirus. **J. Virol. Methods**, Amsterdam, v.137, n.2, p.280-286, 2006.

MONTASSIER, M. F. S.; BRENTANO, L.; RICHTZENHAIN, L.J.; MONTASSIER, H.J. Genetic diversity on S1 glycoprotein of avian infectious bronchitis virus isolated in Brazil between 1988-2000. In: V Int. Symposium on avian corona- and pneumoviruses, 2006, Rauschholzhausen, Germany. **Proceedings ... Giessen : VVB LAUFERSWEILER VERLAG**, 2006, p.119-131.

MOSCOSO, H. et al. Molecular detection and serotyping of infectious bronchitis virus from FTA filter paper. **Avian Dis.**, Kennet Square, v.49, n.1, p.24-29, 2005.

MOUILLESSEAU, K. P. et al. Improvement in the specificity and sensitivity of detection for the Taura syndrome virus and yellow head virus of penaeid shrimp by increasing the amplicom size in SYBR Green real-time RT-PCR. **J. Virol. Methods**, Amsterdam, v.111, n.2, p.121-127, 2003.

NIESTERS, H. G. M. Molecular and diagnostic clinical virology in real time. **Clin. Microbiol. Infect.**, Oxford, v.10, n.1, p.5-11, 2004.

OKINO, C.H., MONTASSIER, M.F.S., GIVISIEZ, P.E.N, FURUYAMA, C.R.A.G., BRENTANO, L., MONTASSIER, H.J. Infectious Bronchitis Virus: Detection and vaccine

strain differentiation by semi-nested RT-PCR. **Rev. Bras. Cienc. Avic.**, Campinas, v.7, n.1, p.59-66, 2005.

OWEN, R. L. et al. Detection of viral antigen following exposure of one-day-old chickens to the Holland-52 strain of IBV. **Avian Pathol.**, Cambs, v.20, n.4, p.663-673, 1991.

PHAM, H. M. et al. Rapid detection and differentiation of Newcastle disease virus by real-time PCR with melting-curve analysis. **Arch. Virol.**, Vienna, v.150, p.2429-2438, n.12, 2005.

RAJ, G. D. et al. Egg: embryo weight ratio as an indicator of dwarfism induced by infections bronchitis virus. **Avian Pathol.**, Cambs, v.33, n.3, p.307-309, 2004.

REED, L. J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent end points. **Am. J. Hyg.**, Baltimore, v.27, p.493-97, 1938.

RICHARDS, G. P. et al. A SYBR Green real-time RT-PCR method to detect and quantitate Norwalk virus in stools. **J. Virol. Methods**, Amsterdam, v.116, n.1, p.63-70, 2004.

ROUX, K. H. Optimization and Troubleshooting in PCR. In : DIEFFENBACH, C. W.; DVESKSLER, G. S. **PCR primer: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1995, p.59-60.

SIDDEL, S. et al. The structure and replication of coronaviruses. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, Berlin, v.99, p.131-163, 1982.

SIDDEL, S. et al. The biology of coronaviruses. **J. Gen. Virol.**, Reading, v.64, n.4, p.761-776, 1983.

SILVA, J. M. L. Bronquite infecciosa das galinhas: como e quando introduzir novas vacinas. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 1989, São Paulo, SP. **Anais...** Campinas: FACTA, 1989. p.75-79.

STERN, D. F.; KENNEDY, S. I. T. Coronavirus multiplication strategy. I. Identification and characterization of virus specific RNA. **J. Virol.**, Washington, v.34, n.3, p.665-674, 1980.

STERN, D. F.; SEFTON, B. M. Coronavirus proteins: biogenesis of avian infectious bronchitis virus proteins. **J. Virol.**, Washington, v.44, n.3, p.794-803, 1982.

STURMAN, L. S.; HOLMES, K. V.; BEHNKE, J. Isolation of coronavirus envelope glycoproteins and interaction with the viral nucleocapsid. **J. Virol.**, Washington, v.33, p.449-462, 1980.

STURMAN, L. S.; HOLMES, K. V. The molecular biology coronaviruses. **Adv. Virus Res.**, San Diego, v.28, p.35-112, 1983.

TAN, S. M. et al. Detection of Newcastle disease virus using a SYBR Green I real time polimerase chain reaction. **Acta Virol.**, Prague, v.48, n.1, p.23-28, 2004.

VARGA, A.; JAMES, D. Real-time RT-PCR and SYBR Green I melting curve analysis for the identification of Plum pox virus strains C, EA, and W: effect of amplicon size, melt rate, and dye translocation. **J. Virol. Methods**, Amsterdam, v.132, n.1-2, p.146-153, 2006.

VILLAREAL, L.Y.B., BRANDÃO, P.E., ASSAYAG, M.M.S., SANINDBERG, A.B.S., TEREZ, J.A., FERREIRA, A.P.F. Propriedades moleculares e biológicas de um coronavirus aviário relacionado aos coronavirus do grupo II. **Rev. Bras. Cien. Avic.**, Campinas, v.8, p.211, 2006.

WANG, C.H.; HONG, C.C.; SEAK, J.C. An ELISA for antibodies against infectious bronchitis virus using an S1 spike polypeptide. **Vet. Microbiol.**, v.85, p.333-342, 2002.

WANG, L.; JUNKER, D.; COLLISON, E. W. Evidence of natural recombination within the S1 gene of infectious bronchitis virus. **Virology**, Duluth, v.192, n.2, p.710-716, 1993.

WANG, C. H.; TSAI C. T. Genetic grouping for the isolates of avian infectious bronchitis virus in Taiwan. **Arch. Virol.**, Vienna, v.141, n.9, p.1677-1688, 1996.

ZWAAGSTRA, K. A., VAN DER ZEIJST, B. A. M.; KUSTERS, J. G. Rapid detection and identification of avian infectious bronchitis virus. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.30, n.1, p.79-84, 1992.

APÊNDICE

Tabela 1. Valores de fluorescência, C(T) e Tm obtidas a partir de amostras do teste de sensibilidade analítica a partir da diluição do LCA infectado com a estirpe M41 do VBI por rt RT-PCR com uso dos “primers” HV+/HV-, e avaliações quanto a presença de crescimento exponencial^a durante a curva de amplificação e especificidade da Tm obtida^b.

Diluição	Fluorescência	C(T)	C.E. ^a	Tm	Tm E ^b
M41 10 ⁰	0,17 (± 0,02)	-	+	76,20 (± 0,14)	+
M41 10 ⁻¹	0,16 (± 0,00)	20,067 (± 2,352)	+	75,90 (± 0,28)	+
M41 10 ⁻²	0,16 (± 0,01)	25,633 (± 0,086)	+	75,90 (± 0,28)	+
M41 10 ⁻³	0,15 (± 0,00)	29,979 (± 0,217)	+	76,20 (± 0,28)	+
M41 10 ⁻⁴	0,09 (± 0,01)	38,834 (± 0,550)	+	75,85 (± 0,21)	+
M41 10 ⁻⁵	0,03 (± 0,00)	-	+	75,85 (± 0,21)	+
CN	0,01 (±0,00)	-	-	-	-

^a Presença de crescimento exponencial durante a curva de amplificação (+), ou ausência (-).

^b A temperatura de dissociação considerada específica (+) encontra-se entre 74 e 78,5°C; e, os valores obtidos fora destes valores foram considerados inespecíficos (-).

Tabela 2. Valores de fluorescência, C(T) e Tm obtidas a partir de amostras do teste de sensibilidade analítica a partir da diluição do cDNA da estirpe M41 por rt RT-PCR com uso dos “primers” HV+/HV-, e avaliações quanto a presença de crescimento exponencial^a durante a curva de amplificação e especificidade da Tm obtida^b.

Diluição	Fluorescência	C(T)	C.E. ^a	Tm	Tm E ^b
M41 10 ⁰	0,19 (± 0,02)	15,23 (± 1,59)	+	75,77 (± 0,15)	+
M41 10 ⁻¹	0,19 (± 0,01)	18,33 (± 1,69)	+	75,35 (± 0,21)	+
M41 10 ⁻²	0,18 (± 0,01)	22,45 (± 1,52)	+	75,35 (± 0,21)	+
M41 10 ⁻³	0,19 (± 0,05)	26,23 (± 1,18)	+	75,35 (± 0,21)	+
M41 10 ⁻⁴	0,17 (± 0,01)	30,44 (± 1,61)	+	75,35 (± 0,21)	+
M41 10 ⁻⁵	0,15 (± 0,00)	35,13 (± 1,31)	+	75,35 (± 0,21)	+
M41 10 ⁻⁶	0,14 (± 0,02)	37,54 (± 0,94)	+	74,85 (± 0,07)	+
M41 10 ⁻⁷	0,06 (± 0,02)	-	+	75,00 (± 0,28)	+
M41 10 ⁻⁸	0,04 (± 0,00)	-	+	76,05 (± 1,20)	+
M41 10 ⁻⁹	0,01 (± 0,00)	-	-	-	-
M41 10 ⁻¹⁰	0,01 (± 0,00)	-	-	-	-
CN	0,01 (± 0,00)	-	-	-	-

^a Presença de crescimento exponencial durante a curva de amplificação (+), ou ausência (-).

^b A temperatura de dissociação considerada específica (+) encontra-se entre 74 e 78,5°C; e, os valores obtidos fora destes valores foram considerados inespecíficos (-).

Tabela 3. Valores de fluorescência, C(T) e Tm obtidas a partir de amostras do teste de sensibilidade analítica a partir da diluição do DNA plasmideal da estirpe M41 por rt RT-PCR com uso dos “primers” HV+/HV-, e avaliações quanto a presença de crescimento exponencial^a durante a curva de amplificação e especificidade da Tm obtida^b.

Diluição	Fluorescência	C(T)	C.E. ^a	Tm	Tm E ^b
M41 10 ⁰	0,17 (± 0,01)	10,26 (± 0,27)	+	75,05 (± 0,07)	+
M41 10 ⁻¹	0,16 (± 0,03)	12,01 (± 0,08)	+	75,90 (± 0,14)	+
M41 10 ⁻²	0,17 (± 0,02)	16,14 (± 0,40)	+	76,05 (± 0,07)	+
M41 10 ⁻³	0,16 (± 0,04)	18,93 (± 0,11)	+	76,20 (± 0,14)	+
M41 10 ⁻⁴	0,17 (± 0,03)	22,61 (± 0,77)	+	76,20 (± 0,14)	+
M41 10 ⁻⁵	0,16 (± 0,01)	25,79 (± 0,64)	+	76,05 (± 0,07)	+
M41 10 ⁻⁶	0,17 (± 0,02)	30,47 (± 0,61)	+	76,05 (± 0,07)	+
M41 10 ⁻⁷	0,13 (± 0,03)	32,62 (± 1,07)	+	75,75 (± 0,07)	+
M41 10 ⁻⁸	0,15 (± 0,02)	36,93 (± 0,36)	+	75,75 (± 0,07)	+
M41 10 ⁻⁹	0,12 (± 0,01)	10,26 (± 0,27)	+	75,75 (± 0,07)	+
M41 10 ⁻¹⁰	0,01 (± 0,01)	-	-	-	-
CN	0,01 (± 0,01)	-	-	-	-

^a Presença de crescimento exponencial durante a curva de amplificação (+), ou ausência (-).

^b A temperatura de dissociação considerada específica (+) encontra-se entre 74 e 78,5°C; e, os valores obtidos fora destes valores foram considerados inespecíficos (-).

Tabela 4. Valores de fluorescência, C(T) e Tm obtidos através da amplificação por PCR em tempo real com a utilização do par de “primers” HV+ / HV- a partir do vírus da Bronquite infecciosa e dos vírus heterólogos testados (pneumovirus, vírus da doença de Newcastle e vírus da doença de Gumboro) e avaliações quanto a presença de crescimento exponencial^a durante a curva de amplificação e especificidade da Tm obtida^b.

	Fluorescência	C(T)	C.E.^a	Tm	Tm E^b
VBI	0,205 (± 0,05)	24,34 (± 1,61)	+	76,10 (± 0,14)	+
Pneumovirus	0,025 (± 0,01)	-	-	-	-
Newcastle	0,02 (± 0,00)	-	-	-	-
Gumboro	0,035 (± 0,02)	-	-	-	-

^a Presença de crescimento exponencial durante a curva de amplificação (+), ou ausência (-).

^b A temperatura de dissociação considerada específica (+) encontra-se entre 74 e 78,5°C; e, os valores obtidos fora destes valores foram considerados inespecíficos (-).

Tabela 5. Valores de fluorescência, C(T) e Tm obtidas a partir de amostras de pulmão das aves experimentalmente infectadas com a estirpe M41 do VBI amplificadas por rt RT-PCR com os “primers” HV+ e HV-, e avaliações quanto a presença de crescimento exponencial^a durante a curva de amplificação e especificidade da Tm obtida^c.

Intervalo (dpi)	Fluorescência	C(T)	C.E. ^a	Tm	Tm E ^c
1	0,03 (± 0,00)	-	-	-	-
2	0,08 (± 0,01)	38,84 (± 0,02)	+	75,85 (± 0,07)	+
3	0,20 (± 0,02)	27,56 (± 1,19)	+	75,85 (± 0,07)	+
4	0,16 (± 0,07)	33,05 (± 2,81)	+	75,85 (± 0,07)	+
5	0,10 (± 0,00)	38,32 (± 0,31)	+	75,85 (± 0,07)	+
6	0,12 (± 0,00)	36,78 (± 3,33)	+	75,9 (± 0,14)	+
7	0,23 (± 0,08)	26,87 (± 0,68)	+	75,9 (± 0,14)	+
8	0,22 (± 0,09)	27,23 (± 0,01)	+	75,9 (± 0,14)	+
9	0,22 (± 0,08)	27,45 (± 0,26)	+	75,9 (± 0,14)	+
10	0,07 (± 0,00)	-	+	75,9 (± 0,14)	+
12	0,17 (± 0,04)	35,59 (± 0,83)	+	75,75 (± 0,07)	+
15	0,14 (± 0,01)	36,44 (± 2,40)	+	75,75 (± 0,07)	+
17	0,05 (± 0,02)	-	-	-	-
20	0,03 (± 0,01)	-	-	-	-
C ^b	0,04 (± 0,00)	-	-	-	-

^a Presença de crescimento exponencial durante a curva de amplificação (+), ou ausência (-).

^b Amostras teciduais das aves do grupo controle negativo

^c A temperatura de dissociação considerada específica (+) encontra-se entre 74 e 78,5°C; e, os valores obtidos fora destes valores foram considerados inespecíficos (-).

Tabela 6. Valores de fluorescência, C(T) e Tm obtidas a partir de amostras de traquéia de aves experimentalmente infectadas com a estirpe M41 do VBI amplificadas por rt RT-PCR com os “primers” HV+ e HV-, e avaliações quanto a presença de crescimento exponencial^a durante a curva de amplificação e especificidade da Tm obtida^c.

Intervalo (dpi)	Fluorescência	C(T)	C.E. ^a	Tm	Tm E ^c
1	0,12 (± 0,01)	36,77 (± 0,06)	+	76,15 (± 0,50)	+
2	0,14 (± 0,00)	17,84 (± 0,28)	+	75,95 (± 0,21)	+
3	0,15 (± 0,01)	19,33 (± 0,88)	+	75,80 (± 0,00)	+
4	0,15 (± 0,01)	18,58 (± 0,24)	+	75,95 (± 0,21)	+
5	0,14 (± 0,00)	25,94 (± 1,02)	+	75,50 (± 0,00)	+
6	0,11 (± 0,02)	35,80 (± 2,90)	+	75,30 (± 0,28)	+
7	0,12 (± 0,01)	29,41 (± 0,26)	+	75,45 (± 0,50)	+
8	0,14 (± 0,01)	28,53 (± 0,12)	+	75,80 (± 0,42)	+
9	0,10 (± 0,02)	33,36 (± 0,00)	+	75,00 (± 0,14)	+
10	0,14 (± 0,00)	31,99 (± 0,14)	+	75,65 (± 0,21)	+
12	0,13 (± 0,01)	34,52 (± 0,04)	+	75,65 (± 0,21)	+
15	0,05 (± 0,00)	-	+	75,20 (± 0,42)	+
17	0,06 (± 0,01)	-	+	75,50 (± 0,00)	+
20	0,07 (± 0,00)	-	+	75,30 (± 0,28)	+
C ^b	0,01 (± 0,00)	-	-	-	-

^a Presença de crescimento exponencial durante a curva de amplificação (+), ou ausência (-).

^b Amostras teciduais das aves do grupo controle negativo

^c A temperatura de dissociação considerada específica (+) encontra-se entre 74 e 78,5°C; e, os valores obtidos fora destes valores foram considerados inespecíficos (-).

Tabela 7. Valores de fluorescência, C(T), e Tm obtidas a partir de amostras de pulmão e de traquéia colhidas das aves experimentalmente infectadas com a estirpe vacinal H120 do VBI amplificadas por rt RT-PCR com o uso dos “primers” HV+/HV-, e avaliações quanto a presença de crescimento exponencial^a durante a curva de amplificação e especificidade da Tm obtida^c.

	Intervalo	Fluorescência	C(T)	C.E.	Tm	Tm E
Pulmão	3	0,05 (± 0,04)	39,39 (± 0,00)	+	76,40 (± 0,28)	+
	5	0,01 (± 0,01)	-	-	-	-
	12	0,02 (± 0,01)	-	-	-	-
	C ^b	0,01 (0,01)	-	-	-	-
Traquéia	3	0,14 (± 0,04)	21,36 (±2,34)	+	77,60 (± 0,14)	+
	5	0,14 (± 0,04)	23,92 (±2,33)	+	77,25 (± 0,07)	+
	12	0,13 (± 0,05)	34,46 (±4,02)	+	76,90 (± 0,14)	+
	C ^b	0,01 (0,01)	-	-	-	-

^a Presença de crescimento exponencial durante a curva de amplificação (+), ou ausência (-).

^b Amostras teciduais das aves do grupo controle negativo

^c A temperatura de dissociação considerada específica (+) encontra-se entre 74 e 78,5°C; e, os valores obtidos fora destes valores foram considerados inespecíficos (-).