

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**PRODUÇÃO DA NUCLEOPROTEÍNA RECOMBINANTE DO
VÍRUS DA INFLUENZA AVIÁRIA PARA APLICAÇÃO NO
IMUNODIAGNÓSTICO**

Mariana Monezi Borzi

Bióloga

2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**PRODUÇÃO DA NUCLEOPROTEÍNA RECOMBINANTE DO
VÍRUS DA INFLUENZA AVIÁRIA PARA APLICAÇÃO NO
IMUNODIAGNÓSTICO**

Mariana Monezi Borzi

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 Microbiologia Agropecuária.

2015

B739p Borzi, Mariana Monezi
Produção da nucleoproteína recombinante do vírus da influenza
aviária para aplicação no imunodiagnóstico / Mariana Monezi Borzi. –
– Jaboticabal, 2015
xiv, 78 p. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2015
Orientadora: Hélio José Montassier
Banca examinadora: Manoel Victor Franco Lemos, Ricardo Luiz
Moro de Souza
Bibliografia

1. ELISA Indireto. 2. Imunodiagnóstico. 3. Nucleoproteína. 4.
Recombinante Vírus-Influenza Aviária. I. Título. II. Jaboticabal-
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias

CDU 576.858:616.921.5

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e
Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
- UNESP, Câmpus de Jaboticabal.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE JABOTICABAL
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: PRODUÇÃO DE NUCLEOPROTEÍNA RECOMBINANTE DO VÍRUS DA INFLUENZA
AVIÁRIA PARA APLICAÇÃO NO IMUNODIAGNÓSTICO

AUTORA: MARIANA MONEZI BORZI

ORIENTADOR: Prof. Dr. HELIO JOSE MONTASSIER

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM MICROBIOLOGIA
AGROPECUÁRIA, pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. HELIO JOSE MONTASSIER

Departamento de Patologia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de
Jaboticabal

Prof. Dr. MANOEL VICTOR FRANCO LEMOS

Departamento de Biologia Aplicada À Agropecuária / Faculdade de Ciências Agrárias e
Veterinárias de Jaboticabal

Prof. Dr. RICARDO LUIZ MORO DE SOUSA

Universidade de São Paulo / Pirassununga/SP

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Mariana Monezi Borzi – Nascida em agosto de 1990, natural de Taquaritinga – São Paulo, Brasil. Formada em Ciências Biológicas (Licenciatura e Bacharelado) pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV de Jaboticabal, São Paulo, no ano de 2012. Durante a graduação participou, como aluna de Iniciação Científica, no período de agosto de 2011 a março de 2013, do projeto n.º 578453/2008-8, intitulado “Clonagem e Expressão da Nucleoproteína (NP) do Vírus da Influenza Aviária em *Escherichia coli*”, o qual também foi seu trabalho de conclusão de curso, orientada pelo Prof. Dr. Hélio José Montassier. Ingressou no mestrado em março de 2013, no programa de Microbiologia Agropecuária na FCAV/UNESP/Jaboticabal. E-mail: mmborzi@gmail.com

Ao meu afilhado João Eduardo,

DEDICO.

Aos meus pais,

OFEREÇO.

*"Tudo tem o seu tempo determinado, e há tempo
para todo o propósito debaixo do céu."
(Eclesiastes 3:1)*

AGRADECIMENTOS

A Deus, alicerce de toda a minha caminhada e guia nas escolhas certas, pelo dom da vida.

Aos meus pais, Fátima e José, pela determinação na minha formação, confiança e amor depositados. Por acreditarem na minha capacidade, me incentivarem durante toda a vida e sempre me encorajarem a seguir em frente, meu eterno agradecimento e a toda a minha família (madrinha, padrinho, todas as minhas tias e minha prima/irmã Marcia), pelo amor, incentivo e orações a mim dedicadas.

Ao Prof. Dr. Hélio José Montassier, exemplo de profissionalismo e inteligência, por seus ensinamentos valiosos que foram fundamentais para meu enriquecimento profissional e a Dr. Maria de Fátima Montassier, pela enorme disposição durante as etapas mais importantes deste projeto.

Aos amigos do Laboratório de Imunologia e Virologia: técnica Maria de Lourdes F. Tamanini (Lurdinha), Viviane Mariguela, Priscila Diniz Lopes, Romeu Moreira dos Santos, Caren Pavani e Filipe Santos Fernando pela constante ajuda e companheirismo em meio ao árduo trabalho, pela paciência e pelas palavras amigas durante os momentos nos quais precisei e também aos amigos do departamento de Microbiologia, em especial Elisabete Schirato, pela amizade sincera e pelos momentos de alegria.

A Prof^a. Dr^a. Janete Aparecida Desidério e a doutoranda Camila Figueiredo, do departamento de Biologia aplicada à Agropecuária, pela disponibilização em auxiliar sempre no que fosse necessário.

Ao Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio Avícola (CAPTA), unidade do Instituto Biológico de Descalvado (SP) pela doação dos soros de referência contra o Vírus da Influenza Aviária.

Ao Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO) de Campinas (SP) pela parceria na condução dos testes de ELISA.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo auxílio financeiro concedido (projeto n.º 578453/2008-8).

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	ix
ABSTRACT	x
LISTA DE QUADROS E TABELAS.....	xii
LISTA DE FIGURAS	xii
1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 A Influenza Aviária	17
2.2 Histórico da doença	17
2.3 Importância na Avicultura Brasileira.....	18
2.4 Etiologia da Influenza Aviária e aspectos estruturais do Vírus da Influenza Aviária	20
2.5 Epidemiologia, patogenicidade e transmissão	24
2.6 Prevenção e Controle	26
2.7 Diagnóstico laboratorial.....	27
2.7.1 Isolamento e caracterização viral	27
2.7.2 Diagnóstico molecular da Influenza Aviária	28
2.7.3 Diagnóstico sorológico da Influenza Aviária	29
3. OBJETIVOS	35
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
4.1 Vírus.....	36
4.2 Amplificação do gene da proteína NP do VIA por PCR	36
4.3 Detecção dos Produtos Amplificados do gene NP do VIA	37
4.4 Quantificação dos produtos amplificados do gene NP do VIA	37
4.5 Clonagem e expressão da Proteína NP do VIA em E. coli	37

4.5.1 Transformação de células competentes da bactéria <i>E. coli</i> por choque térmico	38
4.5.2 Análise dos clones transformantes	39
4.5.3. Sequenciamento de nucleotídeos do inserto do gene NP do VIA dos clones bacterianos transformantes	40
4.6 Indução da expressão da NP recombinante do VIA.....	41
4.7 Análise da expressão da proteína recombinante NP produzida pelos clones transformantes por SDS-PAGE e Western Blotting	41
4.7.1 Dosagem de proteína total e purificada extraída dos clones transformantes submetidos à indução da expressão proteica.....	41
4.7.2 Análise da proteína recombinante por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE).....	42
4.7.3 Análise imunológica da proteína recombinante pela técnica de Western Blotting.....	42
4.8 Purificação da NP recombinante do VIA	43
4.9 Análise <i>in silico</i> da antigenicidade e predição de epítomos da NP recombinante.....	43
4.10 Amostras de soro de aves comerciais	44
4.11 ELISA Indireto com a NP recombinante do VIA (NPr- ELISA-VIA) para a detecção de anticorpos anti-virais específico em soro de galinhas	44
4.12 Elisa comercial	45
4.13 Análise estatística e comparação dos resultados obtidos no NPr-ELISA-VIA em comparação com o teste de ELISA comercial	45
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
5.1 Otimização da temperatura de pareamento dos oligonucleotídeos iniciadores do gene NP do VIA para a PCR.....	47
5.2 Quantificação do DNA amplificado do gene NP do VIA	47
5.3 Identificação dos clones bacterianos portadores do gene NP do VIA após sua inserção no vetor Champion™ pET SUMO Protein Expression System®.....	48
5.4 Sequenciamento de nucleotídeos do inserto do gene NP do VIA nos clones bacterianos transformantes selecionados.....	50

5.5 Indução da expressão e purificação da nucleoproteína recombinante (NPr) do VIA e análise pelas técnicas de SDS-PAGE e de Western blotting	51
5.6 Avaliação da antigenicidade da NPr	55
5.7 Desenvolvimento do Elisa Indireto com a NPr expressada em E. coli	62
5.8 Análise comparativa entre os testes NPr-VIA-ELISA e IDEXX AI AB TEST	63
6. CONCLUSÃO.....	66
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

PRODUÇÃO DA NUCLEOPROTEÍNA RECOMBINANTE DO VÍRUS DA INFLUENZA AVIÁRIA PARA APLICAÇÃO NO IMUNODIAGNÓSTICO

RESUMO - A nucleoproteína (NP) do Vírus da Influenza Aviária (VIA) é um importante alvo antigênico no imunodiagnóstico desta doença, devido à sua baixa variabilidade entre as diferentes estirpes do VIA, resultando em uma elevada reatividade cruzada, e por ser também uma proteína altamente imunogênica para hospedeiros vertebrados. Neste estudo, o gene codificador da NP do VIA foi parcialmente clonado e expresso em *Escherichia coli* como uma proteína recombinante fusionada ao polipeptídeo SUMO e uma etiqueta de poli-histidina para seu uso no desenvolvimento de um ensaio de ELISA indireto para a detecção de anticorpos específicos contra o VIA. A NP recombinante foi expressada na fração solúvel e foi mais facilmente purificada. Após análise em relação aos seus principais sítios de antigenicidade e caracterização por meio de Western blotting, a NP recombinante foi utilizada como uma preparação antigênica no ELISA indireto para detecção de anticorpos contra o VIA presentes em amostras de soro de galinha. A análise comparativa do teste desenvolvido no presente estudo com um ELISA comercial apresentou valores de 95%, 97% e 96,7% de sensibilidade, especificidade e acurácia, respectivamente e um índice kappa de 0,88. Os resultados permitem concluir que a NP recombinante do VIA desenvolvida neste estudo possui características favoráveis para ser aplicada como antígeno no ELISA indireto, constituindo-se em um método sensível e específico para o imunodiagnóstico da Influenza Aviária em galinhas.

Palavras-chave: ELISA Indireto, Imunodiagnóstico, Nucleoproteína Recombinante Vírus da Influenza Aviária.

PRODUCTION OF RECOMBINANT NUCLEOPROTEIN AVIAN INFLUENZA VIRUS FOR USE IM IMMUNODIAGNOSTIC

ABSTRACT - The nucleoprotein (NP) of Avian Influenza Virus (AIV) is an important antigenic target for immunodiagnosis of this disease, due to its low variability among different AIV strains, resulting in high cross-reactivity, and the also highly immunogenic for vertebrate hosts. In this study, the gene encoding NP of AIV was cloned and expressed in *Escherichia coli* as a recombinant protein fused to SUMO polypeptide with a polyhistidine tag and used to develop an indirect ELISA for the detection of AIV-specific antibodies. The recombinant NP was expressed in the soluble fraction and easily purified. After Analysis of the main sites of antigenicity and characterization in Western-Blotting, the recombinant NP was optimized as an antigen preparation for indirect ELISA to detect anti-AIV antibodies in chicken serum samples. The comparative analysis of this ELISA with a commercial ELISA showed values of 95%, 97%, 96.7% of sensitivity, specificity and accuracy, respectively, and an agreement of $k=0.88$. In conclusion, the results indicated that the recombinant NP of AIV produced in this study is a good source of antigen for indirect ELISA and provides a sensitive and specific method for the immunodiagnosis of Avian Influenza in chickens.

Keywords: Avian Influenza Virus, Immunodiagnosis, Indirect ELISA, Nucleoprotein Recombinant.

LISTA DE QUADROS E TABELAS

	Página
Quadro 1. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a amplificação do inserto gênico de 1128 pares de bases (pb) do gene da NP do VIA.	37
Quadro 2. Oligonucleotídeos do vetor pET Sumo (INVITROGEN®) utilizados na PCR para a avaliação dos clones transformantes.....	39
Tabela 1. Posições e tamanhos dos 15 epítomos da NPr preditos pelo método Bepipred Linear Epitope Prediction.	61
Tabela 2. Comparação entre o teste NPr-VIA-ELISA e o teste IDEXX AI Ab Test realizado pelo LANAGRO/SP, para a detecção dos anticorpos anti-VIA presentes em amostras testes de soro de galinha.....	64

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Exemplo de nomenclatura para o Vírus Influenza Aviária A/turkey/Ontario/6118/68.	23
Figura 2. Mapa do vetor de clonagem e expressão pET SUMO (Invitrogen®). Características do vetor pET SUMO: 5643 pares de bases; Promotor T7: bases 209-225; Lac operator (lacO): bases 228-252; Sítio de ligação do ribossomo (RBS): bases 282-288; ATG iniciador: bases 297-299; Epítipo HisG: bases 309-329; ORF SUMO: bases 360-653; Sítio para o oligo SUMO forward: bases 549-571; Sítio de clonagem TA: bases 653-654; Sítio para o oligo T7 reverse: bases 783-802 (c); Terminador T7: bases 744-872; Gene de resistência a canamicina: bases 1431-2246 (c); Origem pBR322: bases 2342-3015; ORF <i>ROP</i> : bases 3383-3574; ORF <i>lacI</i> : bases 4383-5474 (c); (c) = fita complementar	38
Figura 3. Eletroforese em gel de agarose a 1% da PCR gradiente contendo o fragmento gênico amplificado (1128 pb) do VIA. Kb = marcador de tamanho em Kilobases; Canaletas 1 a 12 = amostras do produto amplificado em determinadas temperaturas de pareamento (1- 56°C; 3- 56,8°C; 4- 57,5°C; 5- 58,6°C; 6- 59,9°C; 7- 61,4°C; 8- 62,7°C; 9- 63,7°C; 10- 64,4°C; 11- 64,8°C; 12- 65°C); C = controle negativo da PCR	47
Figura 4. Eletroforese em gel de agarose a 1% contendo o fragmento gênico amplificado do VIA. Kb = marcador molecular em Kilobases; Canaleta 1 = quantidade estimada de DNA em ng/μL.....	48
Figura 5. Eletroforese em gel de agarose a 1% contendo as combinações de oligonucleotídeos iniciadores. Kb = marcador de tamanho molecular em Kilobases; nas canaletas de 1 a 8 os resultados dos clones A11 e A12 submetidos a PCR com combinação dos oligonucleotídeos. Canaletas 1 e 5: PCR inserto/inserto (≈1128pb); canaletas 2 e 6: PCR vetor/vetor (≈1500pb); canaletas 3 e 7: PCR vetor/inserto (≈1827pb) e canaletas 4 e 8: PCR vetor/vetor (≈2000pb)	50

Figura 6. Visualização dos “scores” dos parâmetros determinados para as sequências de nucleotídeos sequenciados dos clones A11 e A12 de *E.coli* transformados pelo vetor pET SUMO (INVITROGEN) produzido nesse trabalho, que foram obtidos através da análise pelo programa BLASTn no site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi>, com destaque para os escores de “E-value” e os de identidade de 99% com relação a sequência do gene NP clonada..... 50

Figura 7. Caracterização por SDS-PAGE da NP recombinante do VIA expressa em *E. coli*. Canaleta 1: marcador de peso molecular; 2: fração do extrato da cultura de *E. coli* não induzida com IPTG; canaletas de 3 a 9: frações solúveis da cinética da indução de expressão, sendo a 3: intervalo de 4h a 0,5mM; 4: intervalo de 4h a 1mM; 5: intervalo de 8h a 0,5mM; 6: intervalo de 8h a 1mM; 7: intervalo de 12h a 0,5mM; 8: intervalo de 12h a 1mM e 9: intervalo de 16h a 1 mM de IPTG; canaleta10: fração do extrato da cultura de *E. coli* contendo apenas o vetor pET SUMO, sem o inserto do gene NP. As setas indicam a proteína NP recombinante do VIA de ~56 kDa 52

Figura 8. Caracterização por Western blotting da NP recombinante do VIA expressa em *E. coli*. Canaleta 1: marcador de peso molecular; 2: fração do extrato da cultura de *E. coli* não induzida com IPTG; canaletas de 3 a 9: frações solúveis da cinética da indução de expressão, sendo a 3: intervalo de 4h a 0,5mM; 4: intervalo de 4h a 1mM; 5: intervalo de 8h a 0,5mM; 6: intervalo de 8h a 1mM; 7: intervalo de 12h a 0,5mM; 8: intervalo de 12h a 1mM e 9: intervalo de 16h a 1 mM de IPTG; canaleta10: fração do extrato da cultura de *E. coli* contendo apenas o vetor pET SUMO, sem o inserto do gene NP. As setas indicam a proteína NP recombinante do VIA de ~56 kDa 52

Figura 9. Caracterização por Western blotting da NP recombinante do VIA expressa em *E. coli* após purificação em resina de níquel-agarose. Canaleta 1: marcador de peso molecular; canaleta 2: fração da cultura não induzida; canaleta 3: fração 1 da purificação da NP recombinante do VIA..... 53

Figura 10. Predição dos epítomos da NPr pelo método de Hopp & Woods. Os picos acima da linha em azul correspondem aos peptídeos que constitui em possíveis epítomos da NPr 57

Figura 11. Comparação da Predição dos epítomos das sequências de aminoácidos da traduzidas das sequências de nucleotídeos do geneclonado da NPr com as predições de epítomos de sequências depositadas no GenBsank. Cada sequência traduzida de aminoácidos está representada por uma cor.....58

Figura 12. Predição dos epítomos da NPr pelo método Bepipred Linear Epitope Prediction. Os picos corados em amarelo correspondem aos peptídeos que constituem possíveis epítomos da NPr 60

Figura 13. Resultado da titulação pelo método indireto de ELISA de diferentes concentrações da proteína NPr do VIA contra diferentes diluições de soros de galinha de referência positiva (S+) e negativa (S-) para o VIA.....63

1. INTRODUÇÃO

A influenza aviária (IA) é uma doença infectocontagiosa que acomete aves silvestres e domésticas, tendo como reservatório natural aves aquáticas e que pode ser transmitida também para outras espécies animais, incluindo suínos, equinos, mamíferos marinhos e seres humanos. Seu agente etiológico é o Vírus da Influenza Aviária (VIA) do tipo A, pertencente a família *Orthomyxoviridae*, gênero *Influenzavirus*. O genoma viral, reconhecido por apresentar uma rápida evolução, é composto por 8 segmentos de RNA de polaridade negativa, os quais codificam as suas proteínas. As glicoproteínas de superfície hemaglutinina (HA) e neuraminidase (NA) são as responsáveis pelas alterações antigênicas observadas nestes vírus ao longo do tempo e que levam ao surgimento de novos subtipos. Estas alterações são fruto de dois processos denominados de *drift* e *shift* antigênico. O *drift* antigênico ocorre devido a mutações pontuais que alteram os aminoácidos nos epítomos destas proteínas. Já o *shift* antigênico é o rearranjo (*reassortment*) de segmentos proteicos entre subtipos virais presentes em uma mesma célula hospedeira.

Além destas proteínas, destaca-se também a Nucleoproteína (NP), por se constituir como uma molécula multifuncional que interage com outras proteínas, inclusive as do organismo hospedeiro, durante a replicação viral. Ao contrário das anteriores, o gene que codifica a NP teve, ao longo do tempo, baixas taxas de modificação de seus aminoácidos e esta se apresenta bastante conservada entre os subtipos virais.

O Brasil é um dos países que está livre desta doença. Porém, a possível ocorrência de surtos da Influenza Aviária em território nacional acarretaria problemas graves à economia do país devido ao decréscimo na produção de ovos e carne de frango, bem como pela imposição de barreiras comerciais por outros países. Desta forma, o rápido diagnóstico da IA para posterior aplicação das medidas de biossegurança contidas no Plano Nacional de Prevenção da Influenza Aviária e de Controle e Prevenção da Doença de Newcastle do Ministério da Agricultura, Pecuária e Desenvolvimento (MAPA) é de suma importância.

O diagnóstico da IA pode ser realizado por métodos moleculares, técnicas clássicas que envolvem o isolamento viral em ovos embrionados, bem como métodos sorológicos que detectam anticorpos contra proteínas altamente conservadas entre os subtipos virais, como, por exemplo, a NP. Dentre estes últimos, destaca-se o teste imunoenzimático ELISA (do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) como um método capaz de avaliar um grande número de amostras em um curto período de tempo.

Existem diversos kits comerciais de ELISA disponíveis para o sorodiagnóstico da influenza em aves domésticas e silvestres e também em suínos e outras espécies de mamíferos. Para a aplicação destes testes imunoenzimáticos, é preciso que as microplacas de ELISA sejam adsorvidas com o antígeno viral purificado sendo que estas preparações antigênicas podem ser obtidas através de diversas formas, tais como a propagação do vírus em ovos embrionados livres de patógenos (SPF) e técnicas de ultra-centrifugação, procedimentos muitas vezes complexos e onerosos.

A expressão de antígenos proteicos virais constitui-se como alternativa para a obtenção destas preparações antigênicas. Atualmente, destaca-se a produção destas proteínas recombinantes, também denominadas de proteínas heterólogas, em sistemas de expressão constituídos por um microrganismo procarioto, como a *Escherichia coli* e um vetor plasmidial de expressão, como por exemplo, os vetores do sistema pET, que permitem a expressão de um nível elevado de proteína recombinante em sua forma solúvel.

Em virtude das considerações acima, o presente estudo teve como objetivo principal produzir a nucleoproteína recombinante do VIA subtipo H4N6 utilizando um sistema de expressão constituído pelo vetor pET-SUMO em células hospedeiras de *E. coli*, para gerar um antígeno viral com potencial de ser aplicado no diagnóstico sorológico da Influenza Aviária.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A Influenza Aviária

Também conhecida como gripe aviária, gripe do frango ou peste aviária, a Influenza Aviária (IA) é uma doença infectocontagiosa que acomete aves domésticas e silvestres e que pode ser transmitida a outras espécies animais, incluindo suínos, equinos, mamíferos marinhos e também seres humanos, o que faz desta doença uma ameaça à saúde, ao bem estar animal e à produtividade da avicultura industrial, se constituindo em uma enfermidade que ocasiona reflexos no comércio nacional e internacional, com prejuízos incalculáveis caso venha a se transformar em uma pandemia (CAPUA; ALEXANDER, 2002; SWAYNE; HALVORSON, 2003).

2.2 Histórico da doença

A primeira descrição da IA data do ano 1878 no norte da Itália, quando Perroncito a definiu como uma doença contagiosa de aves domésticas, associada a uma elevada mortalidade. Inicialmente confundida com a cólera aviária, foi em 1880 que Rivolto e Delprat, baseando-se em propriedades clínicas e patológicas, diferenciaram as duas doenças. Em 1901, teve seu agente causador identificado por Centanni and Savonuzzi, o qual em 1955 foi denominado como o Vírus da Influenza Aviária (VIA). Apesar de o vírus coexistir com os seres humanos a mais de 400 anos, foi no começo do século XX que a doença ganhou uma posição de destaque criando uma grande preocupação em relação à saúde das pessoas, principalmente daquelas que vivem perto de espécies de aves ou que trabalham com seus subprodutos. A pior epidemia desta doença em humanos ocorreu entre o período de 1918 e 1920. Denominada de Gripe Espanhola, foi causada pelo subtipo H1N1 do VIA, e estima-se que cerca de 40 milhões de pessoas vieram a óbito. A segunda epidemia, denominada de Gripe Asiática, aconteceu entre os anos de 1957 e 1960 e teve como causa o subtipo do vírus H2N2. Originária na China espalhou-se rapidamente pelo mundo, ocasionando aproximadamente um milhão de mortos.

Entre 1968 e 1972, também originária no oriente, deu-se a Gripe de Hong-Kong, vitimando o mesmo número de pessoas através do subtipo viral H3N2 (CAPUA; ALEXANDER, 2002; SWAYNE; HALVORSON, 2003; LUPIANI; REDDY, 2009).

Desde a década de 1990, a Organização Mundial da Saúde (OMS) vem monitorando, através de seus laboratórios de referência espalhados pelo mundo, possíveis casos de Influenza com potencial pandêmico. Em 2003, o surto de Gripe Aviária na China causada pelo subtipo H5N1 foi responsável pelo sacrifício de milhões de aves, espalhando-se e causando mortes em outros países como o Vietnã, Tailândia, Indonésia, Camboja, e também no nordeste da África. Em 2009, a OMS confirmou a pandemia mais recente da história, ocasionada pelo vírus H1N1. No Brasil, o Ministério da Saúde confirmou cerca de 50 mil pessoas infectadas, principalmente na região sul do país, sendo que o maior número de óbitos se deu na região sudeste. Porém, medidas governamentais promoveram a drástica redução no número de casos no ano de 2010. Mais recentemente, desde 2013, o subtipo H7N9, que circula normalmente em aves, vem chamando a atenção das autoridades chinesas e, desde o ano de 2014, a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) vem notificando surtos de H5N1 no Oriente e Nordeste da África (AUERBACH et al., 2013; BRASIL, 2010; OIE, 2014; SIMMS; JEGGO, 2014).

2.3 Importância na Avicultura Brasileira

A consolidação da avicultura brasileira se deu a partir da década de 1970, com o início das exportações de carne de frango e, a partir do século XXI, o país se tornou um dos grandes exportadores mundiais, mantendo desde 2004 a posição de maior exportador, quando ultrapassou os Estados Unidos devido ao surto de Influenza Aviária iniciado em 2003, tendo atingido em 2012 a marca histórica de 3,9 milhões de toneladas embarcadas para mais de 150 países. A avicultura emprega mais de 3,6 milhões de pessoas, direta e indiretamente, e responde por quase 1,5% do Produto Interno Bruto (PIB) nacional e, assim como outros setores da economia brasileira, sofreu grande influência das inovações tecnológicas provenientes da Terceira Revolução Industrial, tais como novas técnicas de manuseio animal, processamento e conservação de carnes e melhoramento genético. Além disso, este

setor encontra-se em expansão devido a incentivos fiscais e maior capacitação gerencial e industrial dos funcionários (BELUSSO; HESPANHOL, 2010; MARTINS, 2001; UBABEF, 2013).

O sucesso da avicultura no país depende não somente dos fatores acima citados, mas também do rígido controle contra infecções virais reemergentes, tais como algumas doenças virais comuns como a Doença de Newcastle, Bronquite Infecciosa Aviária e Influenza Aviária. Esta última tem tido destaque na mídia e no meio científico devido ao surgimento de epidemias e pandemias em todo o mundo. Entretanto, o nosso país tem posição de destaque na avicultura industrial mundial, pois está livre da doença. Mesmo assim, medidas de biosseguridade previstas pelo Plano Nacional de Prevenção da Influenza Aviária e de Controle e Prevenção da Doença de Newcastle do Ministério da Agricultura, Pecuária e Desenvolvimento (MAPA) são constantemente implantadas a fim de impedir focos desta enfermidade em território nacional (TAVARES; RIBEIRO, 2007).

Nos motivos que levam o Brasil a estar livre da IA estão incluídos os fatores que inter-relacionam esta enfermidade com as aves silvestres aquáticas e as criações industriais, especialmente a de patos e perus. Devido ao fato do Brasil não ser um grande produtor destas aves, o contato destas duas espécies com as aves silvestres aquáticas é limitado e esporádico. Outro fator seria a baixa resistência do VIA a temperaturas mais elevadas aqui encontradas, o que dificulta sua propagação em território brasileiro (MORAES et al., 2009).

Apesar disso, não se pode desconsiderar o risco que o VIA tem de atingir o país por meio de aves migratórias e também pela movimentação de aves de produção, comércio de materiais genéticos, produtos e subprodutos agrícolas, além de calçados e vestimentas de turistas provenientes de áreas infectadas por esse vírus. Isto porque subtipos patogênicos do vírus podem surgir e causar doenças em aves domésticas em qualquer país, a qualquer momento. Sabe-se que surtos graves da doença ocorrem em intervalos irregulares em todos os continentes, como por exemplo, os surtos em Hong Kong nos anos de 1997-1998 e 2003, Chile em 2002, Holanda em 2003 e Sudeste Asiático no período de 2004 a 2006 (MAPA, 2009; FAO, 2013). Além disso, o Brasil tem estreita relação comercial com países onde houve casos da doença e, inclusive, importa equipamentos e produtos além de

receber técnicos, geneticistas e pesquisadores destes países para atender a demanda da cadeia avícola nacional. Além disso, a avicultura brasileira ainda apresenta algumas debilidades no que se refere ao combate à Influenza, tais como o número reduzido de laboratórios de diagnóstico sentinelas, verbas destinadas à defesa sanitária animal reduzidas, avicultura familiar com controle precário, programa frágil de destinação de resíduos avícolas, dentre outros (FRANCO, 2015).

Em razão de o Brasil ser um dos maiores exportadores de aves do mundo, o risco de um possível surto de Influenza Aviária no país traria consequências graves à economia brasileira devido à imposição de restrições e barreiras comerciais. A repercussão econômica da IA depende da cepa do vírus, espécie de ave afetada, número de granjas com problema, métodos de controle e medidas de erradicação empregadas (MORAES et al., 2009).

Por isso, faz-se necessário fortalecer os serviços de defesa sanitária animal e aumentar as estratégias de prevenção, atuação e investigação sobre a Influenza Aviária, monitorando continuamente a doença nas populações de risco, de forma que exista acompanhamento das possíveis suspeitas clínicas e coleta correta de material (MAPA, 2009; CARON; SOCCOL, 2009).

2.4 Etiologia da Influenza Aviária e aspectos estruturais do Vírus da Influenza Aviária

A família Orthomyxoviridae compreende o gênero Influenzavirus, do qual fazem parte os VIA tipo A, B e C. Os três tipos são classificados de acordo com as diferenças da proteína do nucleocapsídeo, também denominada nucleoproteína (NP) e as proteínas de Matriz (M1 e M2). A proteína M1 tem como função a montagem de novos vírus nas células hospedeiras. Já a M2 é uma proteína transmembrana que facilita o transporte do vírus através das membranas celulares durante sua replicação. Estudos sobre o efeito da amantidina, utilizada na profilaxia e tratamento de infecções pelo VIA, sugeriu-se que a função da proteína M2 como canal iônico permite que íons Na^+ e H^+ entrem na partícula viral durante o seu desnudamento. Além disto, esta proteína está envolvida na modulação do pH de compartimentos intracelulares, uma vez que está expressa de forma abundante na

membrana celular (SCHROEDER et al., 1994; MARTINS, 2001; PIELAK; CHOUA, 2010).

O VIA tipo B tem como reservatório exclusivo os seres humanos e, apesar de estirpes desse tipo viral sofrerem variações antigênicas, elas estão mais associadas com a etiologia de surtos epidêmicos mais localizados. O VIA tipo C tem como reservatórios humanos e suínos e são antigenicamente estáveis, provocando formas subclínicas de influenza e não ocasionam epidemias, motivo pelo qual merecem menos destaque em termos de saúde pública. Em contrapartida, as estirpes do tipo A do VIA são encontradas em várias espécies animais, causando surtos alternados e epidemias anuais em aves e mamíferos, inclusive seres humanos, durante o inverno, tanto do hemisfério norte quanto do sul (HILLEMANN, 2002; BREIER, 2005; BRASIL, 2005; 2010). As estirpes do tipo A são também classificadas em subtipos de acordo com a antigenicidade de suas glicoproteínas de superfície que se caracterizam como projeções do envelope viral, a hemaglutinina (HA), sendo 16 existentes, e a neuraminidase (NA), que ao todo são nove. Existem 144 possibilidades de combinações entre estas proteínas e 103 delas já são bem conhecidas (MORAIS et al., 2009; FRANCO, 2015). Moléculas de HA formam trímeros e estão envolvidas com a adsorção aos receptores da célula hospedeira e fusão entre o envelope viral e a membrana citoplasmática, sendo também responsável pela atividade hemaglutinante do vírus. Por sua vez, as moléculas de NA formam tetrâmeros e estão relacionadas à liberação das partículas virais a partir dos receptores da célula hospedeira, permitindo a propagação da progênie. Tanto a HA quanto a NA possuem genes extremamente variáveis, apresentando menos de 30% de aminoácidos conservados entre os subtipos virais (WEBSTER, 1992; LEE; SAIF, 2009). Ao contrário, estudos comprovam um alto nível de similaridade dos genes da NP, entre tipos e subtipos, mesmo que os vírus sejam isolados de diferentes espécies hospedeiras (SHU et al., 1993). Além destas proteínas, também constituem o vírus as proteínas não estruturais NS1 e NS2, localizadas no citoplasma da célula hospedeira, no entanto não incorporadas na progênie viral e que possuem diversas funções, sendo relacionadas com a patogenicidade da estirpe viral (WEBSTER, 1992).

Os vírions do VIA exibem uma variedade de formas e tamanhos, de partículas esféricas a filamentos alongados, com diâmetro de aproximadamente 80 a 120 nm. O nucleocapsídeo é helicoidal e o genoma viral codifica as suas proteínas estruturais e não estruturais, sendo composto de 8 segmentos de RNA fita simples, que variam de 900 a 2350 nucleotídeos, de polaridade negativa, associados a NP formando o complexo ribonucleoproteico (RNP). A NP não somente se associa a segmentos do RNA, mas se constitui como o principal componente interno do vírus, que interage durante sua replicação com outras proteínas virais, as subunidades de polimerases PB1, PB2 e PA, e também com proteínas da célula hospedeira (COX; SUBBARAO, 2000; PORTELA; DIGARD, 2002; LI et al., 2009). A PB1 (polimerase básica 1) participa da adição dos nucleotídeos durante o alongamento do RNA e da ligação nas extremidades terminais do RNA viral (RNAv) e do RNA complementar (RNAc) para iniciar a transcrição e replicação (GONZALES; ORTIN, 1999). A PB2 (polimerase básica 2) participa na ligação do CAP nas moléculas pré mRNA (BLAAS et al., 1982). A proteína PA tem um papel importante no mecanismo de transcrição e replicação quando ocorrem algumas mutações virais (PALESE; SHAW, 2007).

A replicação viral inicia-se com a adsorção do vírus à célula hospedeira, pela afinidade dos anti-receptores do envelope viral (hemaglutininas) aos aceptores da célula hospedeira (ácido siálico). A hemaglutinina deve ser clivada por proteases celulares em sítios específicos a fim de que o vírus possa se fundir na membrana da célula. Esta capacidade de clivagem é o principal fator que determina a patogenia do subtipo viral (BOSCH, 1981). Após a penetração, o vírus sofre descapsidação no citoplasma celular e o RNA viral migra para o núcleo onde servirá de molde para a síntese de RNA mensageiro (RNAm) para a posterior tradução dos componentes virais. As novas moléculas de RNA saem da célula, juntamente com as proteínas virais, por um processo denominado brotamento, momento em que a neuraminidase é responsável pelo rompimento das ligações da hemaglutinina das novas partículas virais com os receptores da membrana celular, permitindo assim a liberação de novos vírus que infectarão outras células hospedeiras (MORAES et al., 2009).

A composição química aproximada do VIA é de 0,8 a 1,1% de RNA, 70 a 75% de proteínas, 20 a 24% de lipídeos, os quais estão localizados na membrana viral, sendo muitos fosfolipídeos, e 5 a 8% de carboidratos, como a ribose, galactose,

manose, fucose e glicosaminas. Por se constituir como um vírus envelopado o VIA é sensível a solventes orgânicos e detergentes, os quais destroem a integridade de sua membrana que também pode ser destruída por β -propiolactona, agentes oxidantes, éter, dentre outros compostos químicos, reduzindo a infectividade viral. O vírus também é inativado pelo calor, luz ultra-violeta, radiações gama, pH extremos, condições não isotônicas e em ambientes extremamente secos (MORAES et al., 2009) .

Segundo Moraes et al. (2009), o sistema de nomenclatura padrão para este vírus, imposto pela OMS, inclui: o tipo de vírus influenza (A, B ou C), espécie do hospedeiro (quando diferente da espécie humana), localização geográfica onde o vírus foi isolado pela primeira vez, número que a amostra recebe no laboratório (quando houver) e ano do isolamento do vírus. Quando é influenza do tipo A, a descrição dos antígenos de superfície do vírus, ou seja, da hemaglutinina e da neuraminidase, é apresentada entre parênteses, como demonstrado na figura a seguir:

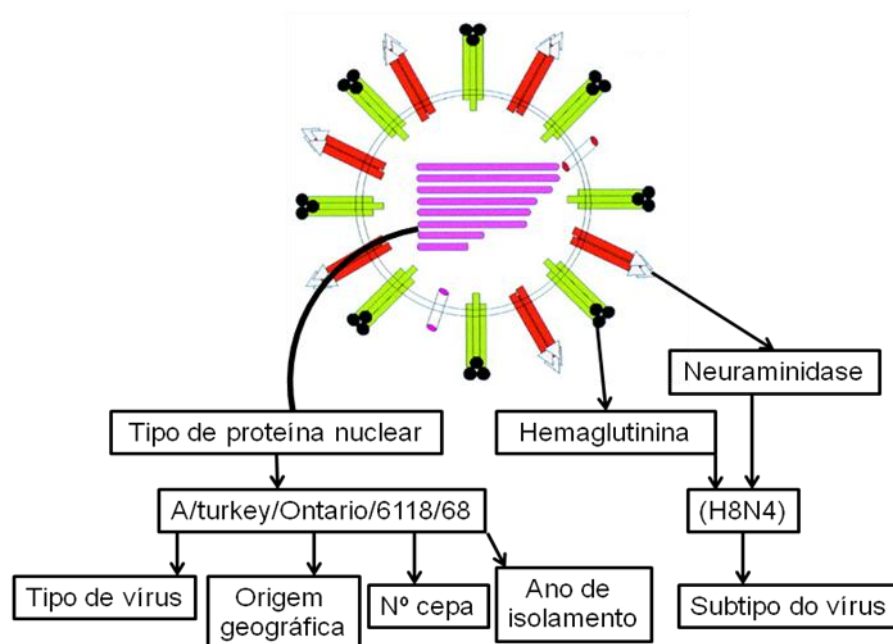


Figura 1. Exemplo de nomenclatura para o Vírus Influenza Aviária A/turkey/Ontario/6118/68.

2.5 Epidemiologia, patogenicidade e transmissão

Estudos epidemiológicos da IA comprovam que as aves silvestres, principalmente as aquáticas (pertencentes às Ordens Anseriformes – como patos, gansos, marrecos, cisnes, e Charadriiformes – maçaricos, batuíras, gaivotas) são reservatórios naturais de todos os subtipos do vírus da influenza, com destaque para os subtipos H3, H4, H6 e H7. No entanto, não existem relatos sobre problemas significativos causados pelo VIA nestas aves, sendo que esse vírus se replica preferencialmente no trato gastrointestinal dessas aves silvestres (ALEXANDER, 2000; FRANCO, 2015; BRASIL, 2009; WEBSTER et al, 1978).

Durante muito tempo, a infecção pelo VIA foi se perpetuando e o vírus se difundindo na forma de mutantes e/ou recombinantes capazes de infectar outras espécies animais, como mamíferos marinhos, suínos, equinos, aves domésticas e humanos (MURPHY; WEBSTER, 1996). Por conta disso, o VIA é reconhecido por apresentar uma rápida evolução, inclusive em hospedeiros humanos, embora alguns estudos demonstrem que, em aves aquáticas, tem se observado o contrário nos últimos 60 anos.

As glicoproteínas de superfície HA e NA são as portadoras das principais alterações antigênicas observadas nestes vírus ao longo do tempo. O *drift* antigênico ocorre devido a mutações pontuais que alteram os aminoácidos nos epítomos destas proteínas enquanto o *shift* antigênico é o rearranjo (*reassortment*) de segmentos proteicos entre subtipos virais presentes em uma mesma célula hospedeira. É uma condição própria de vírus com genoma segmentado e leva ao surgimento de um novo subtipo que possui segmentos gênicos de estirpes diferentes. Este mecanismo também pode levar ao aparecimento de variantes que transpõe a barreira entre as espécies, como por exemplo, o surgimento da estirpe altamente virulenta do vírus H5N1, resultante da recombinação dos vírus de humanos e aves em um hospedeiro suíno, e considerada de alto risco para o desenvolvimento de uma pandemia de gripe humana (BREIER, 2005; MORAES et al., 2009; LEE e SAIF, 2009).

Apesar da frequência com que os subtipos de VIA são isolados de aves domésticas em muitos países, em nenhum deles a doença é considerada endêmica. Mesmo quando os surtos de IA ocorrem regularmente, a variação considerável no

subtipo do vírus, as diferenças no número de focos visto ano após ano e a relação sazonal de surtos sugerem que as infecções pelo VIA são resultantes de introduções de novas estirpes, sendo que a principal fonte desses novos vírus seriam as aves selvagens. Desta forma, as estirpes do VIA são mais propensas a infectar aves domésticas criadas de uma maneira que permite o contato com as selvagens, ao contrário das criadas em confinamento, principalmente quando estão situadas nas rotas migratórias de aves aquáticas (OIE, 2014).

Em aves domésticas a estirpe do VIA pode ser classificada de acordo com a gravidade da doença que ela ocasiona, isto é, de baixa patogenicidade (LPAI, sigla em inglês para *low pathogenic avian influenza*), na qual infecta basicamente o sistema respiratório dos animais, causando leve declínio na produção de ovos, ou de alta patogenicidade (HPAI, sigla em inglês para *highly pathogenic avian influenza*), sendo os subtipos H5 e H7 considerados como HPAI. Estes subtipos podem exterminar uma criação ou granja de aves em apenas 24 horas, pois se replicam sistematicamente nas aves infectadas, afetando não somente o trato respiratório como também o reprodutivo e gastrointestinal (YANG et al., 2008; SÁ; SILVA et al., 2013).

Em linhas gerais, os sinais clínicos da doença variam de acordo com a idade e a espécie afetada, características biológicas dos vírus, subtipo antigênico e também a ocorrência ou não de infecções subsequentes, sobretudo as causadoras de imunodepressão em aves, como por exemplo, a doença de Gumboro, doença de Marek, Anemia Infecciosa das Galinhas e até mesmo estresse ambiental (BRASIL, 2009; MORAES et al., 2009). Desta forma, os sinais se manifestam desde uma infecção subclínica a uma doença suave respiratória das vias superiores ou doença fatal generalizada das aves domésticas, sendo que os índices de morbidade e mortalidade variam de 1% a 100%. Ocorrem problemas respiratórios nas aves como tosse, espirro, corrimento nasal e ocular; acarretando decréscimo na produção de ovos, consumo de alimento e água, podendo haver diarreia, desordens nervosas, entre outros. Mesmo que a infecção viral seja branda, quando causada por um vírus LPAI, não deve ser ignorada do ponto de vista comercial. Ademais, pode ser observada morte súbita nos animais, sem apresentarem os sintomas clínicos da doença. Os sinais clínicos podem ser confundidos com os de outras doenças, tais

como a doença de Newcastle, Pneumovirose Aviária, Bronquite Infecciosa das galinhas, entre outras e as infecções concorrentes podem mascarar o seu diagnóstico (PAIVA et al., 2009; MORAES; SALLE, 2009).

A transmissão ocorre dentro da mesma espécie, com exceção dos suínos, animais cujas células têm receptores para os vírus humanos e aviários, o que leva ao surgimento das novas variantes (BRASIL, 2009). A transmissão pode ocorrer pelo contato direto de um animal doente para um sadio através de secreções nasais, traqueais, pulmonares e digestivas, como também pelo contato indireto por meio de equipamentos, roupas, calçados, alimentos, água insetos, aves e animais silvestres. Em relação aos humanos, a influenza é transmitida de pessoa a pessoa por meio de aerossóis (SANTOS et al., 2000; IBIAPINA et al., 2005; NICHOLSON, 1998).

O período de incubação do VIA em aves varia com a espécie de ave e seu status imunitário, estirpe do vírus e se é HPAI ou LPAI, da via de infecção, dose infectante e de desafio. Esse período pode variar de poucas horas para as aves inoculadas por via intravenosa, 3 dias em infecções de aves criadas individualmente a 14 dias em aves de galpão. (BRASIL, 2009; EASTERDAY et al., 1997; BERCHIERI JR; MACARI, 2000).

2.6 Prevenção e Controle

Como a principal fonte de propagação do VIA para as aves sadias são aves infectadas, as principais medidas para o controle da doença envolvem a separação destas aves doentes das demais, por meio de isolamento, quarentena e abate. Outras medidas de biossegurança devem ser efetuadas, tais como: remoção da sujeira, esterco e outros materiais orgânicos das superfícies; lavagem e aplicação de desinfetantes nas gaiolas, bebedouros, comedouros, veículos e outros equipamentos; descarte apropriado das aves mortas; trabalhadores das granjas devem tomar banho e trocar de roupa ao entrar e sair das localidades.

Ainda, é preciso proteger as aves sadias do contato com aves silvestres, principalmente as aquáticas e migratórias e atentar ao fato de que os suínos também podem servir como fonte do vírus, principalmente para perus, com transmissão mecânica ou por pessoas infectadas (BERCHIERI JR; MACARI, 2000; MORAES; SALLE, 2009).

2.7 Diagnóstico laboratorial

A Influenza Aviária pertence à lista A de doenças de notificação obrigatória da Organização Internacional de Epizootias (OIE, 2014). Todas as suspeitas da doença devem ser comunicadas ao Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), a fim de que o órgão tome as medidas imprescindíveis para o controle da doença presentes no Plano de Contingência para Influenza Aviária e Doença de Newcastle (BRASIL, 2009).

Os recentes surtos mundiais da doença demonstraram o grande desafio que é o seu controle em áreas com alta densidade populacional de aves de criação. Qualquer demora na detecção e identificação do seu agente etiológico implica uma disseminação acelerada e de maior alcance da IA. Assim, é de extrema importância a identificação imediata de lotes de aves infectadas através de técnicas de diagnóstico rápidas e confiáveis, a fim de que as medidas de erradicação sejam rapidamente adotadas (CATTOLI et al., 2004; PELZEL et al., 2006).

A história clínica de problemas respiratórios, diarreias e sinais nervosos, com alta mortalidade das aves afetadas e o aparecimento de lesões hemorrágicas nas cristas e barbelas levam a um diagnóstico apenas presuntivo, pois estes sinais também são característicos de outras enfermidades. O diagnóstico definitivo da Influenza Aviária pode ser realizado por métodos diretos, que detectam o agente infeccioso e métodos indiretos, através de testes sorológicos. O material coletado pode ser originado de suabes traqueais e cloacais, fragmentos de órgãos como pulmão, traqueia, intestino, cérebro e fígado (MORAES; SALLE, 2009; SWAYNE; HALVORSON, 2003, MAPA, 2009, RUPLEY, 1999).

2.7.1 Isolamento e caracterização viral

A técnica padrão, aceita pela OIE, para o diagnóstico do Vírus da Influenza Aviária e avaliação em amostras clínicas é o isolamento viral em ovos embrionados livres de agentes infecciosos específicos (SPF – do inglês *Specific Pathogen Free*), de 9 a 11 dias de incubação, via saco alantóide. Os ovos devem ser incubados entre 35° e 37°C e observados por até 7 dias sendo que a mortalidade nas primeiras 24 horas deve ser considerada como fruto de contaminações. Amostras de VIA de alta

patogenicidade podem matar o embrião entre 24 e 48 horas. Após 48 horas, o líquido cório-alantóide (LCA) ou amniótico deve ser colhido e armazenado para análise por meio do teste de hemaglutinação (HA) de hemácias de galinha. Se a amostra isolada mostrar atividade hemaglutinante é necessário diferenciá-la de outros vírus hemaglutinantes, principalmente descartar os paramixovírus, como por exemplo, o Vírus da Doença de Newcastle. Após resultado positivo, prossegue-se com o Teste de Inibição da Hemaglutinação (HI) seguido da técnica de neutralização viral e teste para caracterização de patogenicidade, através de inoculação em ovos embrionados e aves (ALEXANDER, 2003; OIE, 2014; MARTINS, 2001; MAPA, 2009).

Apesar do isolamento do vírus em ovos embrionados SPF ser considerado o meio mais confiável de verificar se um plantel de aves está infectado ou não, constitui-se num método demorado e laborioso. Além disso, quando o surto ocorre em uma área de elevada densidade populacional de aves de criação, um grande número de amostras devem ser processadas, o que exige um elevado número de ovos SPF, os quais nem sempre estão disponíveis em curto prazo. Por isso, este método é realizado principalmente para diagnóstico do primeiro caso clínico e para obtenção de vírus isolados com o propósito de análises laboratoriais. Desta forma, a utilização de outros métodos validados e que sejam rápidos é aconselhável (CATTOLI et al., 2004; OIE, 2014).

2.7.2 Diagnóstico molecular da Influenza Aviária

Entre os métodos moleculares mais utilizados para o diagnóstico da Influenza Aviária destacam-se as Reação de Transcrição Reversa (RT) seguida da Reação em Cadeira pela Polimerase (PCR) convencional, a qual foi utilizada com sucesso durante os surtos no ano de 2003, na Holanda, do VIA de alta patogenicidade, no qual Gall et al. (2008; 2009) desenvolveram oligonucleotídeos iniciadores específicos para a detecção do sítio de clivagem da proteína HA como também fragmentos gênicos da NA. Esta técnica ainda pode ser associada ao sequenciamento de nucleotídeos do DNA complementar (cDNA) amplificado por este método (SUAREZ et al., 2007). No entanto, a PCR em Tempo Real é o método preferível para o diagnóstico de infecções pelo VIA visto que é mais sensível e

realizado em um menor período de tempo, como relatam, por exemplo, Spackman et al. (2002), que utilizaram a RT-PCR em Tempo Real “single-step” utilizando como sonda um fluoróforo, para a detecção dos subtipos H5 e H7, obtendo bons resultados de sensibilidade e especificidade em comparação com o isolamento viral em apenas 3 horas de duração. Apesar disso, esta técnica pode levar ao surgimento de resultados falso-negativos quando utilizado esfregaços de fezes, fezes e tecidos de algumas espécies de aves como amostras, devido a substâncias inibidoras da PCR (DAS et al., 2006), problema este que pode ser solucionado com o uso de controles internos positivos e negativos, bem como cuidados extras durante a extração de RNA (OIE, 2014).

Outro método baseado na amplificação de sequências de nucleotídeos de proteínas virais específicas é a Amplificação Isotérmica mediada pela Alça (LAMP), na qual não há necessidade de aparelho de ciclagem térmica. Porém a LAMP possui algumas limitações em sua aplicação relacionadas às possíveis mutações virais que afetariam as regiões alvo do conjunto de seis oligonucleotídeos iniciadores utilizados (POSTEL et al., 2010).

2.7.3 Diagnóstico sorológico da Influenza Aviária

Embora os métodos moleculares tenham se mostrado muito eficientes para o diagnóstico direto do VIA, a detecção de anticorpos contra antígenos virais específicos por métodos sorológicos é considerada uma alternativa importante para a prevenção e controle da doença devido ao fato de que, durante a sua evolução, o agente causador pode vir a ser eliminado, porém os anticorpos permanecem, demonstrando que a infecção ocorreu. Desta forma, a detecção de anticorpos contra antígenos virais por métodos sorológicos é usada para triagem de amostras de campo, principalmente de alta patogenicidade, se constituindo como uma forma indireta para o diagnóstico da Influenza Aviária, impedindo surtos epidêmicos que podem acarretar perdas econômicas e até mesmo problemas na saúde pública em todo o mundo (OIE, 2014).

Dentre os métodos mais utilizados para o imunodiagnóstico da IA encontram-se os testes de Imunodifusão em Gel de Ágar (AGID), Inibição da Hemaglutinação (HI) e ELISA. A Imunodifusão em Gel de Ágar (AGID) é um teste de triagem

sorológica realizado para a detecção de anticorpos contra a presença das proteínas NP e de Matriz, na qual utilizam-se soros hiperimunes anti-VIA. Porém, esta técnica apresenta como desvantagem o tempo de duração longo para a análise das amostras e a baixa sensibilidade, apesar da sua elevada especificidade. Além disso, nem todas as espécies de aves produzem anticorpos precipitantes após infecção pelo VIA, que é o caso dos patos (OIE, 2014). Em contrapartida, o teste de HI apresenta excelente especificidade e boa sensibilidade, sendo amplamente empregado para detecção dos subtipos H5 e H7e teste padrão para a detecção de muitas outras doenças. Não há necessidade de tratamento prévio dos soros. Porém, é um teste limitado para vários subtipos de HA do VIA e pode haver resultados positivos inespecíficos para amostras de aves não galiformes. Já o teste de ELISA é sensível, específico, estável e de baixo custo, depende de menor quantidade de preparações de antígeno e anticorpos, além de possibilitar a avaliação de um maior número de amostras em um curto período de tempo (JENSEN et al., 2013; WU et al., 2007; MAPA, 2009; OIE, 2014; CATTOLI; TERREGINO, 2008; SPACKMAN, 2008).

Muitos trabalhos envolvendo a detecção de anticorpos de aves contra antígenos convencionais ou recombinantes de outros vírus, demonstraram que os testes de ELISA desenvolvidos possuem sensibilidade e especificidade elevadas tanto quanto os testes de HI (OLIVEIRA et al., 2013; GONÇALVES, 2010; SILVA et al., 2014). No caso do sorodiagnóstico da IA, os laboratórios geralmente usam o teste de ELISA como uma ferramenta de triagem e o teste AGID para confirmação dos resultados positivos (JENSEN et al., 2013; TESSARI, 2015; WU et al., 2007).

Existem vários kits comerciais de ELISA disponíveis, tanto na sua forma indireta, como de bloqueio e competitivo, para a detecção de anticorpos contra o VIA e métodos de sanduíche-ELISA que detectam a NP viral, os quais são comumente empregados para o diagnóstico da IA em diversas espécies de aves e também em suínos e outras espécies de mamíferos (CIACCI-ZANELLA, 2010; DE BOER et al., 1990; JIN et al., 2004; ZHOU et al., 1998). Isto se deve ao fato de que, apesar do VIA apresentar uma rápida evolução manifestada na sua extensiva diversidade genética e antigênica entre todos os seus subtipos, o que é típico da maioria dos vírus contendo RNA em seus genomas, o gene que codifica a NP teve ao longo do

tempo baixas taxas de modificação de seus nucleotídeos (CHEN et al., 2006; GORMAN et al., 1990; SHU et al., 1993).

Para a realização dos métodos indiretos de ELISA, é necessário que as placas sejam adsorvidas com o antígeno viral específico purificado. Para a obtenção de preparações antigênicas para tal finalidade, é preciso então propagar em escala maior o VIA em ovos embrionados SPF ou em culturas celulares, seguido de processos complexos de purificação viral por técnicas de ultra-centrifugação em gradiente de sacarose, o que torna a preparação da técnica ELISA mais demorada e mais onerosa (WILSON et al., 1984; RIVETZ et al., 1985; MIERS et al., 1994).

Várias pesquisas estão sendo realizadas a fim de solucionar este último problema, envolvendo a expressão de proteínas virais heterólogas para serem utilizadas como antígenos recombinantes no diagnóstico de doenças virais. Nesse sentido, foi demonstrado que a clonagem e expressão destas proteínas recombinantes podem ser realizadas por meio de vetores apropriados e em diversos tipos de sistemas de expressão, tais como bactérias, leveduras e células de insetos transfectadas com baculovírus (ABUBAKAR et al., 2011; JIN et al., 2004; SHAFER et al., 1998; ZHOU et al., 1998).

Com relação especificamente ao VIA, foi verificado que a NP é o principal componente interno viral e se constitui em uma molécula multifuncional, que não somente se associa aos segmentos de RNA genômico desse vírus, como também interage durante a replicação viral com outras proteínas do próprio vírus e também da célula hospedeira (PORTELA; DIGARD, 2002). Além disso, através de estudos envolvendo o alinhamento de sequências de nucleotídeos e análises filogenéticas, Shu et al. (1993) demonstraram que existe uma elevada similaridade entre as sequências de nucleotídeos dos genes das NPs de estipes do VIA, mesmo que isoladas de diferentes hospedeiros. Desta forma, por se tratar de uma proteína altamente conservada e que apresenta elevada imunogenicidade, a NP recombinante do VIA constitui-se um antígeno de eleição para ser aplicada no imunodiagnóstico da IA (CAPUA; ALEXANDER, 2002; MARTINS, 2001; SWAYNE; HALVORSON, 2003; VARICH, 2014; YANG et al., 2008).

Em razão disso, muitos estudos fizeram uso da NP recombinante para detecção pela técnica de ELISA de anticorpos anti-VIA. Por exemplo, Shafer et al.

(1998) desenvolveram um ELISA competitivo para detecção do gene NP do VIA utilizando células hospedeiras de inseto e baculovírus como vetor para expressão da NP recombinante da estirpe H2N2 do VIA. Jin et al. (2004) expressaram no sistema *E. coli*, e sob a forma insolúvel, um fragmento recombinante de NP (a partir do aminoácido 47 até o 384) do subtipo H5N1 de AIV, para usar como um antígeno de revestimento em um método indireto de ELISA. Sullivan et al. (2009) desenvolveram um ELISA de bloqueio utilizando uma NP recombinante comercial (Imgenex) clonada a partir do VIA H1N1 para a detecção de anticorpos contra os subtipos H3N2, H4N8, H4N6 e H8N4 do VIA em aves e mamíferos silvestres. Além disso, Wu et al. (2007) e Upadhyay et al. (2009) expressaram a NP recombinante do subtipo H9N2 em células de *E. coli* e *Saccharomyces cerevisiae*, respectivamente, sendo que ambos os trabalhos desenvolveram métodos indiretos de ELISA para detecção de anticorpos contra o VIA em soros de aves. Deve-se salientar, no caso, que estas e outras pesquisas incluem a produção de proteínas recombinantes de diversos subtipos do VIA, porém não dos subtipos H3 e H4, que são os mais encontrados em aves selvagens, as quais consistem na principal fonte de novos subtipos do vírus que emergem e recirculam em aves domésticas e outras espécies de animais, o que implica em significantes perdas econômicas e problemas de saúde pública em todo o mundo. Apesar destes se constituírem como fonte de novos subtipos, o gene codificador da NP encontra-se altamente conservado (PANIGRAHY et al., 2002; PEPIN et al., 2012A, 2012B; WEBSTER et al., 1992).

Nesse contexto ainda, é amplamente conhecido que a bactéria *E. coli* tem sido o microorganismo mais utilizado em biologia molecular para a produção de proteínas recombinantes em quantidades suficientes para diferentes usos. Isto se deve ao fato de que a *E. coli* possui uma genética bastante conhecida, com vários genes já sequenciados. Em geral, seus genomas apresentam a capacidade de aceitar material genético estranho, derivado de outro organismo, sendo o gene exógeno replicado e, na maioria dos casos, traduzido da mesma maneira que o DNA nativo da bactéria. Além disso, a produção de proteínas recombinantes em *E. coli* possui como vantagens o crescimento bacteriano rápido, a produção em um curto período de tempo de quantidades elevadas de proteínas, pouco espaço físico para armazenamento das células e meios de crescimento relativamente simples, além de

procedimentos de extração e purificação da proteína recombinante menos complexos (PELCZAR, 1996; BROWN, 2003; MICKLOS; FREYER, 2003; SAMBROOK; RUSSEL, 2001; WALSH, 1998).

Apesar disso, a *E. coli* tem sido pouco utilizada para a produção da NP recombinante do VIA, devido ao fato de que esta proteína mostrou ser de difícil expressão neste sistema e na maioria das vezes, é recuperada apenas a partir da fração insolúvel, requerendo várias procedimentos para sua purificação (JIN et al., 2004; WU et al., 2007).

Para contornar este tipo de situação, estudos mostram que a expressão de proteínas recombinantes fusionadas a determinados peptídeos incrementa os níveis de proteína recombinante expressa na sua forma solúvel, por meio de sua atuação como chaperonas (MAKRIDES, 1996). Dentre estes peptídeos de fusão, destacam-se o uso da proteína de ligação à maltose (MBP), a Glutathione S-transferase (GST), a thioredoxina (Trx) e o peptídeo SUMO (ZUO et al., 2005).

Alguns vetores, como os chamados sistemas pET, originários do plasmídeo pBR322, incorporam o gene do peptídeo SUMO, originário de *S. cerevisiae*, e que faz parte da família das ubiquitinas. Foi demonstrado que o papel desse peptídeo é regular muitos processos celulares, e um dos vetores desse tipo mais empregados é o pET SUMO, o qual é utilizado para clonar e expressar o gene de interesse fusionado ao gene codificador do peptídeo SUMO. O interessante, nesse caso, é que a expressão desse peptídeo à proteína recombinante que se deseja expressar acarreta um aumento significativo nos níveis de expressão desta última em sua forma solúvel. Além disso, após a indução da expressão, o SUMO pode ser clivado por uma SUMO protease, facilitando a obtenção da proteína desejada em sua forma nativa, sem aminoácidos extras. Ademais, este vetor possui uma cabeça de polihistidina N-terminal denominada 6His-tag, uma sequência de seis histidinas consecutivas, que cria um sítio de ligação para o níquel e outros metais, propriedade essa que é utilizada posteriormente para a purificação da proteína recombinante em coluna de níquel-agarose, além de constituir-se como um peptídeo sinal que facilita a secreção da proteína desejada (ZUO et al., 2005, YOUNG et al., 2012).

Em virtude de tudo o que foi exposto, julgou-se oportuno, no presente estudo, clonar e expressar a Nucleoproteína do subtipo H4N6 do VIA, utilizando um sistema

constituído pelo vetor pET-SUMO e célula hospedeiras de *E. coli*, como um meio de expressão mais simples e eficiente, para gerar, na forma solúvel, um antígeno recombinante viral como a NP com potencial de ser aplicado no diagnóstico sorológico da Influenza Aviária.

3. OBJETIVOS

Contribuir com o aprimoramento do imunodiagnóstico e do controle da Influenza Aviária por meio da clonagem e expressão da Nucleoproteína do VIA subtipo H4N6 em sua forma solúvel, fazendo uso de um sistema heterólogo de expressão constituído pelo vetor pET SUMO e as células hospedeiras procariotas *E. coli*, a fim de que a NP recombinante seja utilizada como antígeno no teste de ELISA indireto para a detecção de anticorpos anti- VIA em soro de aves.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Vírus

O subtipo H4N6 do VIA tipo A foi propagado em ovos embrionados livres de patógenos (SPF) e o RNA viral foi extraído com o kit Trizol (Invitrogen), seguindo as indicações do fabricante. Em seguida, foi realizada a Reação de Transcrição reversa (RT) utilizando-se Random Primers com o RNA extraído para a obtenção do DNA complementar (cDNA). Estas amostras de cDNA foram fornecidas pelo Laboratório Nacional Agropecuário (Lanagro), unidade do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) localizado em Campinas/SP. Todos os procedimentos com o vírus, envolvendo a extração do RNA viral e a Reação de Transcrição Reversa foram executados pelo Laboratório de Biossegurança Nível 3 (NB-3) do Lanagro /SP.

4.2 Amplificação do gene da proteína NP do VIA por PCR

Oligonucleotídeos iniciadores desenhados por Yang et al. (2008) e Jin et al. (2004), denominados neste estudo como NP+ direto e NP- reverso (Quadro 1), com alterações necessárias para posterior clonagem gênica, foram utilizados para a amplificação de uma porção de 1128 pares de bases (pb) do gene da NP do VIA. Foram utilizados 0,2mM de dNTPs , 5 µL de tampão de PCR (10X), 20pmol de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores, 1,5 mM de MgCl₂, 2,0 U da enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen), completando-se o volume (q.s.p) com água tratada com DEPC e adicionando-se 5 µL de cDNA viral. As temperaturas e os passos da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) foram previamente otimizados, em função, principalmente, das características físico-químicas dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados e utilizando-se um gradiente de temperaturas de pareamento. O programa que apresentou o melhor desempenho, foi constituído de um primeiro ciclo de 95°C por 5 min, seguido de outros 35 ciclos, cada um constituído por três passos; (94°C por 1 min, para desnaturação da dupla fita de DNA, 55°C por 1 minuto e 30 s, para o pareamento dos oligonucleotídeos iniciadores e 72°C por 2 min e 30 s

de extensão) e a 72°C por 10 min de extensão final em termociclador MJ RESEARCH®.

Quadro 1. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a amplificação do inserto gênico de 1128 pares de bases (pb) do gene da NP do VIA.

Iniciadores	Sequência 5' - 3'
NP+ direto	5' - ATGCACATCATGGCGTCTCAA -3'
N- reverso	5' - TGATGGAGTCCATTGTTCCA -3'

4.3 Detecção dos Produtos Amplificados do gene NP do VIA

Os produtos amplificados na PCR foram submetidos à eletroforese em cuba horizontal, em gel de agarose (1,0%) imerso em tampão TBE 0,5x Tris-Borato (0,045M), EDTA (1mM) e submetido a uma corrida de voltagem adequada às dimensões do gel (1 a 10V/cm). A visualização dos produtos amplificados foi realizada através da transiluminação do gel em luz ultravioleta, após corar em solução com corante Gel Red (UNISCIENCE®).

4.4 Quantificação dos produtos amplificados do gene NP do VIA

A quantificação em ng/μL dos produtos de PCR foi realizada com o auxílio do marcador de quantidade estimada de DNA (Low DNA Mass Ladder – INVITROGEN®), após terem sido submetidos à eletroforese de gel de agarose a 1%, como também através de espectrofotometria, utilizando-se o espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Scientific®) para verificação da qualidade do material, anteriormente à ligação aos vetores de clonagem e expressão.

4.5 Clonagem e expressão da Proteína NP do VIA em E. coli

Para a clonagem do inserto gênico NP foi utilizado o vetor de expressão Champion™ pET SUMO “Protein Expression System” (INVITROGEN®), seguindo, em linhas gerais, as indicações do manual do fabricante (Figura 2).

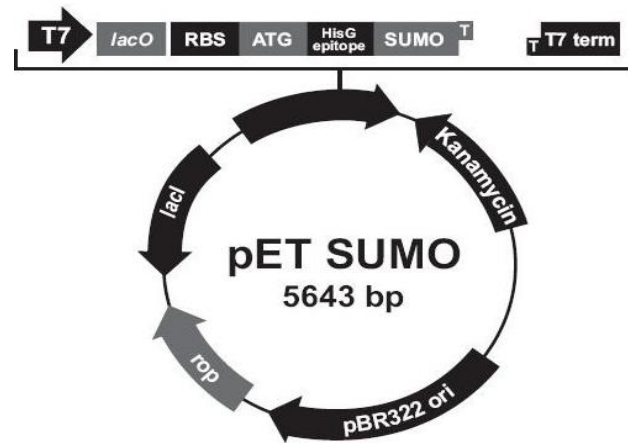


Figura 2. Mapa do vetor de clonagem e expressão pET SUMO (Invitrogen®). Características do vetor pET SUMO: 5643 pares de bases; Promotor T7: bases 209-225; Lac operator (lacO): bases 228-252; Sítio de ligação do ribossomo (RBS): bases 282-288; ATG iniciador: bases 297-299; Epítipo HisG: bases 309-329; ORF SUMO: bases 360-653; Sítio para o oligo SUMO forward: bases 549-571; Sítio de clonagem TA: bases 653-654; Sítio para o oligo T7 reverse: bases 783-802 (c); Terminador T7: bases 744-872; Gene de resistência a canamicina: bases 1431-2246 (c); Origem pBR322: bases 2342-3015; ORF *ROP*: bases 3383-3574; ORF *lacI*: bases 4383-5474 (c); (c) = fita complementar.

4.5.1 Transformação de células competentes da bactéria *E. coli* por choque térmico

O procedimento de transformação bacteriana foi realizado conforme o protocolo descrito por Hanahan et al (1983), sendo utilizada a linhagem One shot mach 1 – T1 para clonagem e para a expressão foi usada a linhagem de bactérias BL21, quimicamente competentes. Tubos contendo as células competentes foram removidos do freezer e mantidos em gelo para descongelamento lento, em média por 30 min, em seguida adicionou-se um volume contendo 40 ng de DNA plasmidial, extraído do clone identificado com portador do gene NP do VIA, seguindo-se de agitação suave e repouso em banho de gelo por 30 min. Após este tempo, a suspensão de células foi submetida ao choque térmico pela imersão do tubo em banho-maria a 42°C por 60 segundos, transferindo-se novamente para gelo e mantendo-se assim por 2 minutos. Em seguida, foram adicionados a cada tubo 800 µL de meio SOC à temperatura ambiente, seguido de incubação a 37°C sob agitação a 150 rpm por 1 hora e 30 minutos. Decorrido esse tempo, uma alíquota de

50 µL (da linhagem One shot mach 1 – T1) e 100 µL (BL21), foram semeadas em placas contendo meio 2xTY sólido (1,5% de ágar bacteriológico Sigma-Aldrich®) com 50 µg/mL de canamicina. As placas foram incubadas em estufa a 37°C por 16 horas. Os clones transformantes foram selecionados e estas colônias foram transferidas de forma organizada para uma caixa de 96 tubos (“cluster”), contendo meio 2xTY com 50 µg/mL de canamicina, para crescimento a 37°C, posterior estocagem em glicerol (80%) e manutenção a – 70°C.

4.5.2 Análise dos clones transformantes

Alguns clones obtidos na transformação de *E. coli* One shot mach 1 – T1 foram submetidos à extração de DNA plasmidial com o uso do Kit Wizard Plus SV Miniprep DNA Purification System (Promega®), seguindo protocolo descrito pelo fabricante. A análise da presença do inserto do gene NP foi feita com base no tamanho dos fragmentos amplificados nas PCRs com combinações 2 a 2 de cada um dos dois pares de oligonucleotídeos iniciadores NP+ direto e NP- reverso, descritos no Quadro 1, e da seqüências que flanqueiam os sítios de clonagem no vetor pET-SUMO (Invitrogen®), conforme descrito no Quadro 2, usando-se para comparação um padrão de peso molecular 1kb Plus DNA Ladder (Invitrogen®).

Quadro 2. Oligonucleotídeos do vetor pET Sumo (INVITROGEN®) utilizados na PCR para a avaliação dos clones transformantes.

Iniciadores	Sequência 5`- 3`	Posição genoma vetor (bp)
SUMO forward	5`-AGATTCTTGTACGACGGTATTAG-3`	549-571
T7 reverse	5`- TAGTTATTGCTCAGCGGTGG-3`	744-872

Em suma, para análise do DNA obtido a partir das mini-preparações e posterior seleção dos clones selecionados a partir da transformação, foi feita uma PCR para a obtenção de toda a região codificadora do gene NP do VIA e também do vetor com o intuito de se identificar os clones que continham o inserto gênico. Para tanto, foram utilizados 0,2mM de dNTPs , 5 µL de tampão de PCR (10X), 20pmol de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores, 1,5 mM de MgCl₂, 2,0 U da enzima Taq

DNA polimerase (Invitrogen®), completando-se o volume (q.s.p) com água tratada com DEPC e adicionando-se 2,5 µL de DNA plasmidial obtido na extração dos clones transformantes. Todas as reações foram realizadas em um termociclador MJ RESEARCH®. As temperaturas e os passos da PCR foram otimizados, em função das características físico-químicos dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados. Após a avaliação mencionada foi definido um programa ideal de incubação para a PCR do inserto NP, que ficou constituído por um primeiro ciclo de 95°C por 5 minutos, seguindo para outros de 35 ciclos, cada um constituído por três passos: 94°C por 1 minuto, para desnaturação da dupla hélice do DNA plasmidial, 56,2°C por 2 minutos, para o anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores e 72°C por 3 minutos de extensão, e para extensão final, 72°C por 10 minutos. O perfil térmico para a PCR com os oligonucleotídeos iniciadores do vetor foi: um primeiro ciclo de 95°C por 5 min, seguido de outros de 35 ciclos, cada um constituído por três passos: 94°C por 1 min, para desnaturação da dupla hélice do DNA plasmidial, 55°C por 1 min e 30 s, para o pareamento dos oligonucleotídeos iniciadores e 72°C por 2 min e 30 s de extensão, e para extensão final, 72°C por 10 min.

A análise do gene amplificado na PCR foi realizada através da eletroforese em cuba horizontal e a visualização dos produtos amplificados se deu através da transiluminação do gel em luz ultravioleta, nas mesmas condições anteriormente citadas.

4.5.3. Sequenciamento de nucleotídeos do inserto do gene NP do VIA dos clones bacterianos transformantes

As amostras de DNA obtidas das extrações de cada um dos clones bacterianos foram submetidas à reação de sequenciamento utilizando-se o kit DNA Sequencing-Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready ABI Prism - versão 3.0, no sequenciador automático ABI 3730 XL DNA Analyzer (Applied Biosystems®). A sequência de nucleotídeos foi compilada e analisada inicialmente pelo programa BIOEDIT, usando-se o programa Clustal W e comparando a similaridade de cada um dos clones analisados com as sequências depositadas no GenBank para a Nucleoproteína do VIA.

4.6 Indução da expressão da NP recombinante do VIA

Após confirmação da clonagem do inserto em células da linhagem One shot mach 1 – T1, um clone foi selecionado para extração de DNA plasmidial, sendo este material transformado em *E. coli* da linhagem BL21. Para a indução da expressão da nucleoproteína recombinante os clones transformantes de *E. coli* da linhagem BL21 foram selecionados e, em seguida, semeados em placas com 2xTY sólido (1,5g de ágar bacteriológico) acrescido de canamicina 50 µg/mL incubados a 37°C por 16 horas e, em seguida repassadas em 10mL de meio 2xTY com agitação e incubadas 250rpm a 37°C por 16 horas. Após a incubação foi transferido 1 mL da cultura em 50 mL de meio 2xTY e incubados a 37°C com agitação de 200rpm até atingir Densidade Óptica entre 600 e 800 nm. Nesse momento 0,5 mM e 1 mM de IPTG (Isopropyl-β-Dthiogalactopyranoside) foi adicionado, sendo a cultura incubada a 22°C durante 4, 8, 12 e 16 horas com agitação de 200rpm. Após incubação as células foram centrifugadas 12000rpm por 10 min a temperatura ambiente, o sobrenadante descartado e as células ressuspensas em 3 mL de tampão de lise (50 mM fosfato potássio, 400 mM NaCl, 100 mM KCL, 10% glicerol, 0.5% triton X-100, 1 mM de PMSF e 10mM imidazol, pH 7.8). A lise celular foi realizada em sonicador de células (Sonics Vibra Cell, Sonics & Materials, VCX 500), permanecendo 4 ciclos de 30 segundos cada, com os tubos contendo o extrato celular em banho de gelo. Em seguida o material foi centrifugado a 12000rpm por 10 min a 4°C, sendo o sobrenadante guardado para análise imunoquímica a -20 °C, pois o sobrenadante poderia conter as proteínas solúveis, enquanto o sedimento contém as proteínas insolúveis.

4.7 Análise da expressão da proteína recombinante NP produzida pelos clones transformantes por SDS-PAGE e Western Blotting

4.7.1 Dosagem de proteína total e purificada extraída dos clones transformantes submetidos à indução da expressão proteica

Para a análise da expressão dos clones por SDS-PAGE e Western Blotting, foi determinada a quantidade de proteína total presente no extrato celular

bacteriano, obtido após a expressão e purificação com a resina de níquel-agarose por meio do kit “Protein Assay” (Bio-rad®), baseado no método descrito por Bradford (1976), seguindo as instruções do fabricante e usando-se uma solução padrão de soroalbumina bovina com a concentração proteica a 1 mg/mL.

4.7.2 Análise da proteína recombinante por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE)

As amostras a serem analisadas foram diluídas em tampão para amostra contendo 62,5mM Tris-HCl, pH 6,8, 1% SDS, 10% de glicerol, 0,001% de azul de bromofenol e 1% de 2-mercaptoetanol. Após fervura por 2 minutos as amostras foram aplicadas em 2 géis de poliacrilamida com concentração de 12% no gel de separação. A separação das proteínas foi realizada pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS. As bandas polipeptídicas foram, ao final, detectadas, em um dos géis, através da coloração com “Coomassie Brilliant blue R-250”, enquanto que o outro gel foi usado para a eletrotransferência para a membrana de nitrocelulose, seguindo-se a realização da técnica de Western Blotting.

4.7.3 Análise imunológica da proteína recombinante pela técnica de Western Blotting

Foi realizada a técnica de Western Blotting, sendo em geral, adotado o protocolo de Towbin et al. (1979), buscando-se fazer a detecção da proteína NP recombinante com o anticorpo monoclonal contra a etiqueta de polihistidina (Sigma®). Após eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS, os polipeptídeos foram transferidos para uma membrana de HPVDF (GE Healthcare®), a qual foi em seguida bloqueada com leite em pó desnatado a 5% em tampão PBS. A diluição do anticorpo monoclonal foi de 1:1000 preparado em PBS acrescido de 10% de LPD, sendo esta fase da reação incubada sob agitação por 1 h a temperatura ambiente. O conjugado anti-IgG de camundongo com a peroxidase (Sigma®) foi utilizado na diluição de 1:1000 em PBS acrescido de 10% de LPD e incubado por 1 h sob agitação, para revelar a ligação antígeno-anticorpo. Em

seguida, a membrana foi lavada com PBS-Tween 20 (PBST) e PBS, sendo a revelação de cor da reação feita após a adição do substrato cromógeno específico (DAB mais ureia) (Sigma-Aldrich®).

4.8 Purificação da NP recombinante do VIA

A purificação da proteína recombinante NP do VIA foi feita por interação com a resina de afinidade composta por níquel – agarose (Ni Sepharose High Performance/Amersham Biosciense®) de acordo com as recomendações do fabricante da resina. Em resumo, o extrato bruto de bactéria transformada contendo a proteína recombinante foi clarificado por meio de centrifugação a 10,000 x g por 10 minutos a 4°C, e 1 mL do sobrenadante obtido foi misturado com 1ml da resina de níquel-agarose. A mistura foi deixada em contato por 1 hora e depois, tratada com os tampões de lavagem e o tampão de eluição, sendo eluída a proteína recombinante da matriz da resina após a aplicação do tampão de eluição contendo 500 mM de Imidazol (Sigma-Aldrich®). Frações de 1 ml foram colhidas da coluna. Após o procedimento de purificação, as preparações dessa proteína recombinante foram estocadas a -20°C, sendo determinada a concentração proteica pelo método de Bradford (1976), bem como as características imunoquímicas através da técnica de Western Blotting.

4.9 Análise *in silico* da antigenicidade e predição de epítomos da NP recombinante

A sequência de aminoácidos deduzida a partir do sequenciamento de nucleotídeos da NPr foi analisada em relação aos possíveis sítios principais de antigenicidade (epítomos), observando as alterações em relação a outras sequências da NP do VIA depositadas no GenBank: GU052384, CY067273, CY005555, CY092164, CY005570, CY015084, CY005614, CY130153, CY130097 e CM76603. O método de Hopp e Woods (Hopp e Woods, 1981) associado ao software Bio Edit Sequence Alignment Editor versão 7.0.2 foi utilizado para avaliar os valores de hidrofiliicidade das sequências de aminoácidos deduzidas da NPr expressa nesse estudo e de sequências de aminoácidos de outros subtipos do VIA, em relação a

cada resíduo na sequência de aminoácidos deduzidas, gerando gráficos com perfis hidrofobicidade correspondentes e de forma a compará-los entre si. A predição de epítopos antigênicos da NPr também foi realizada, a partir do uso do programa Bepipred Linear Epitope Prediction (Larsen et al, 2006).

4.10 Amostras de soro de aves comerciais

Amostras de soros negativos para o VIA foram obtidas de um pool de soro de aves da espécie *Gallus gallus* livre de patógenos específicos (SPF) e a amostra de soro hiperimune positiva para o VIA foi fornecida pelo Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio Avícola (CAPTA), unidade do Instituto Biológico localizado em Descalvado, SP. Um conjunto de 121 amostras de soros de aves comerciais infectadas experimentalmente foi fornecido pelo Lanagro, SP.

4.11 ELISA Indireto com a NP recombinante do VIA (NPr- ELISA-VIA) para a detecção de anticorpos anti-virais específico em soro de galinhas

Baseando-se no protocolo desenvolvido por Silva et al. (2014), foi realizado um teste de ELISA indireto para titulação da NPr como antígeno, no qual quatro concentrações (2, 4, 8 e 16 µg/mL) dessa proteína foram testadas, sendo que cada uma foi distribuída para reagir com seis diluições (1:50; 1:100; 1:400; 1:800 e 1:1600) dos soros positivo e negativo para o VIA e que foram utilizados como controles, positivo ou negativo, neste experimento, a fim de se determinar a melhor concentração de NPr e a melhor diluição dos soros. Placas com 96 cavidades (Costar®) foram adsorvidas com 50 µL de uma solução da NPr preparada em tampão carbonato/bicarbonato (0.05M, pH 9.6). Foram incubadas a 4°C, durante 16h, lavadas três vezes com PBS-Tween-20 e bloqueadas por 45 min com 100 µL por cavidade de tampão de bloqueio (10% de leite em pó desnatado, 0,2% Tween 20, 0,02% de azida de sódio em PBS). A seguir, as placas foram lavadas com PBS Tween 20 três vezes e então 50 µL por cavidade das amostras de soro de galinha (anticorpo primário), diluídas no tampão de bloqueio, foram adicionadas, sendo feita, em seguida a incubação à temperatura de 37°C por 1 h. As placas foram então novamente lavadas com PBS-Tween 20, por três vezes, e depois foi adicionado, na

diluição de 1:1.000, o conjugado imunoenzimático constituído por IgG de coelho anti-IgG de galinha com a peroxidase. As placas foram, a seguir, incubadas a 37°C por 1h e, ao final desta etapa, foram lavadas por três vezes, tal como se descreveu anteriormente.

Em seguida, foi feita a adição de 50 µL/cavidade, da mistura substrato-cromógeno (1% peróxido de hidrogênio - H₂O₂ / 2mg de Orto-fenileno-diamina-OPD), preparada em tampão citrato-fosfato pH 5.0, deixando-se a reação ocorrer por 15 min à temperatura ambiente, quando foram adicionados 50 µL/cavidade de HCl 2M para bloquear a atividade enzimática. As densidades ópticas (DOs) obtidas foram mensuradas em leitor de placas de ELISA (Bio-rad® - Modelo 550) e no comprimento de onda de 490 nm. Para cada amostra de soro, a densidade óptica (DO) média das duplicatas (DOMTS) foi expressa em relação à DO média das duplicatas do soro de referência positivo (DOMPRS) e das duplicatas de soro de referência negativo (DOMNRS), como a denominada relação amostra/positivo e de acordo com a fórmula $A/P = (DOMTS - DOMNRS) / (DOMPRS - DOMNRS)$.

4.12 Elisa comercial

O kit IDEXX AI Ab Test (IDEXX Laboratories) foi utilizado de acordo com as instruções do fabricante para testar o conjunto de 121 amostras de soro de galinhas e comparar os resultados com aqueles que foram obtidos no teste de NPr-ELISA-VIA.

4.13 Análise estatística e comparação dos resultados obtidos no NPr-ELISA-VIA em comparação com o teste de ELISA comercial

Os resultados obtidos utilizando a NPr para detecção de anticorpos contra o VIA presentes em soros de aves foi comparado com os resultados obtidos pelo teste de ELISA comercial IDEXX AI Ab Test (IDEXX Laboratories®) utilizado pelo LANAGRO/SP, com o mesmo conjunto de soros testados. Os cálculos da sensibilidade, especificidade, acurácia e concordância (coeficiente kappa) foram determinados de acordo com Mohan et al. (2006). Para o coeficiente kappa (k), $k < 0.2$ indica uma baixa concordância, $0.2 < k < 0.4$ indica uma concordância fraca, 0.4

$k < 0.6$ indica uma moderada e $0.6 < k < 0.8$ indica uma boa concordância e por fim, $k > 0.8$ indica grau perfeito de concordância entre os testes (LANDIS; KOCH, 1997).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Otimização da temperatura de pareamento dos oligonucleotídeos iniciadores do gene NP do VIA para a PCR

Para se obter um melhor resultado e confirmar a temperatura adequada para o pareamento dos oligonucleotídeos, foi realizado através do Termociclador MJ RESEARCH®, um gradiente com as seguintes temperaturas: 1- 56°C; 2- 56,2°C; 3- 56,8°C; 4- 57,5°C; 5- 58,6°C; 6- 59,9°C; 7- 61,4°C; 8- 62,7°C; 9- 63,7°C; 10- 64,4°C; 11- 64,8°C; 12- 65°C, verificando-se que a segunda temperatura correspondeu melhor ao perfil de pareamento dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados (Figura 3).

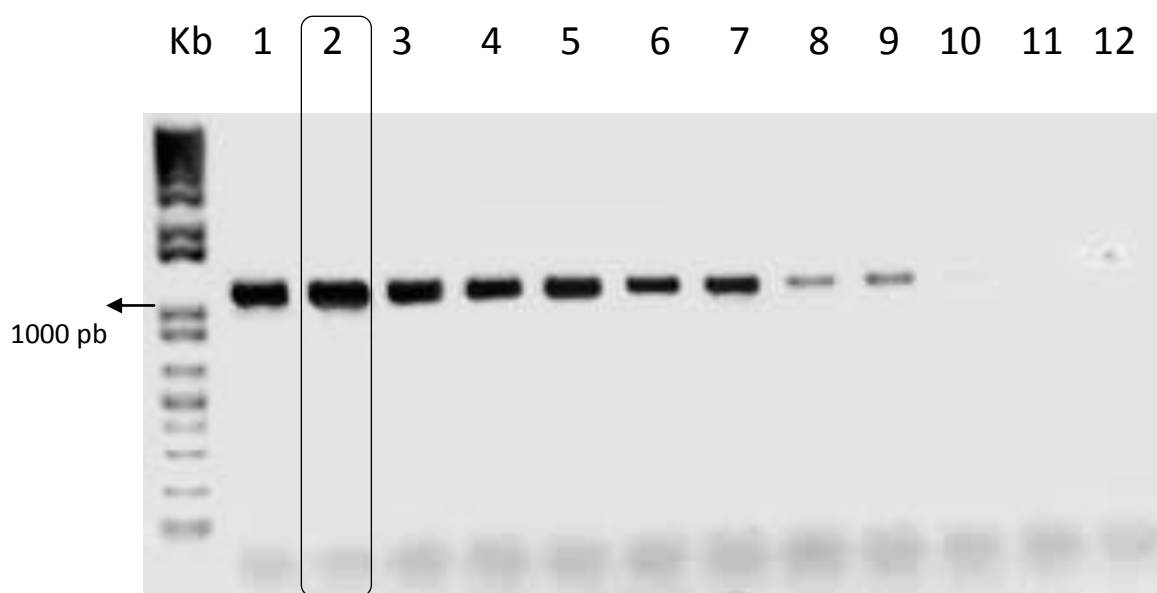


Figura 3. Eletroforese em gel de agarose a 1% da PCR gradiente contendo o fragmento gênico amplificado (1128 pb) do VIA. Kb = marcador de tamanho em Kilobases; Canaletas 1 a 12 = amostras do produto amplificado em determinadas temperaturas de pareamento (1- 56°C; 3- 56,8°C; 4- 57,5°C; 5- 58,6°C; 6- 59,9°C; 7- 61,4°C; 8- 62,7°C; 9- 63,7°C; 10- 64,4°C; 11- 64,8°C; 12- 65°C); C = controle negativo da PCR.

5.2 Quantificação do DNA amplificado do gene NP do VIA

Para prosseguir com o procedimento de clonagem do gene da NP do VIA era necessário que o DNA estivesse puro e íntegro, pois mesmo uma excelente e

avançado método molecular pode ser prejudicado pela baixa qualidade das amostras (BRENTANO, 2011). Para tanto, a leitura em espectrofotômetro dos produtos amplificados foi realizada, sempre respeitando a relação de 260/280 maior que 1,8 para prosseguir com as etapas de clonagem. Além disto, após purificação dos produtos, foi realizada novamente uma corrida eletroforética, juntamente com o marcador Low DNA Mass Ladder (Invitrogen®) para quantificar o total de DNA presente nas amostras, bem como sua integridade, como demonstrado na Figura 4, onde se observa a quantificação de 80 ng/μL para o produto de PCR, resultado semelhante ao obtido por espectrofotometria, e levado em conta para a posterior ligação do fragmento no vetor de clonagem e expressão.

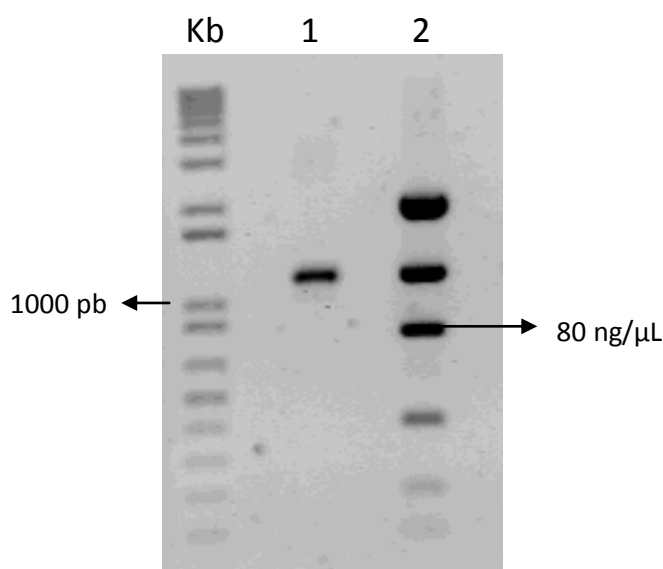


Figura 4. Eletroforese em gel de agarose a 1% contendo o fragmento gênico amplificado do VIA. Kb = marcador molecular em Kilobases; Canaleta 1 = quantidade estimada de DNA em ng/μL.

5.3 Identificação dos clones bacterianos portadores do gene NP do VIA após sua inserção no vetor Champion™ pET SUMO Protein Expression System®

Após transformação bacteriana foram obtidos 96 clones transformantes da linhagem de *E.coli* One Shot Mach 1 – T1. Dois destes clones (A11 e A12) foram então selecionados de maneira aleatória para se pesquisar a presença do vetor contendo o inserto gênico, por meio da detecção dos produtos amplificados na PCR com a combinação de iniciadores específicos para o gene de interesse ou para o

vetor nas amostras do DNA plasmidial extraídas desses mesmos clones. Inicialmente, foi verificado que na reação de PCR realizada com os oligonucleotídeos iniciadores NP+ direto e NP- reverso houve a amplificação de toda a região gênica codificadora do gene, gerando um fragmento com o tamanho próximo ao esperado (1128 pb). Os dois clones geraram todos os produtos amplificados a partir de cada uma das combinações com dois a dois dos oligonucleotídeos iniciadores, nos tamanhos esperados, conforme demonstrado na Figura 5; nas canaletas 1 e 5, foi amplificado o gene NP do VIA no tamanho próximo de 1128 pb. Nas canaletas 2 a 6, estão demonstrados os produtos das amplificações das reações realizadas com o oligonucleotídeo iniciador senso do gene NP (NP+ direto) juntamente com o oligonucleotídeo iniciador anti-senso do vetor (T7 reverso), sendo que o tamanho esperado para esses produtos amplificados era em torno de 1500 pb. Nas canaletas 3 e 7 estão representados os resultados das amplificações dos produtos amplificados com a utilização dos oligonucleotídeos iniciadores, senso para o vetor (SUMO forward) juntamente com o oligonucleotídeo iniciador anti-senso do gene NP (NP- reverso), com tamanhos esperados de 1827 pb. Por fim, nas canaletas 4 e 8 estão demonstrados os resultados das amplificações quando a PCR foi realizada com os oligonucleotídeos iniciadores senso e anti-senso específicos para o vetor, sendo que os tamanhos esperados para esses produtos amplificados era de aproximadamente 2000pb.

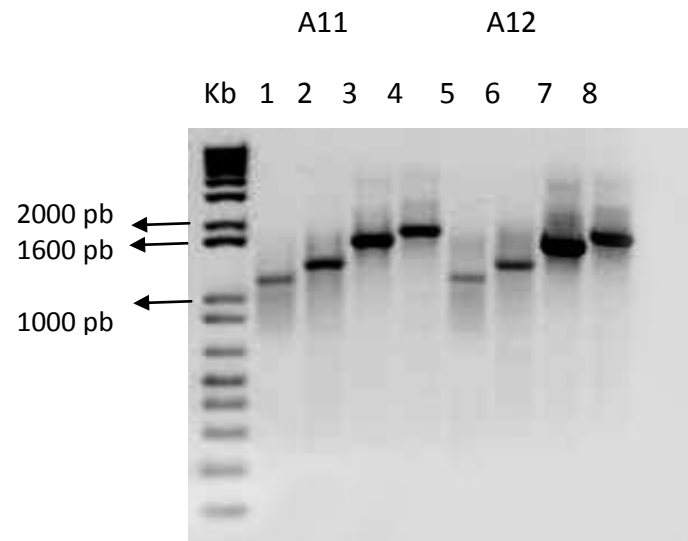


Figura 5. Eletroforese em gel de agarose a 1% contendo as combinações de oligonucleotídeos iniciadores. Kb = marcador de tamanho molecular em Kilobases; nas canaletas de 1 a 8 os resultados dos clones A11 e A12 submetidos a PCR com combinação dos oligonucleotídeos. Canaletas 1 e 5: PCR inserto/inserto (≈ 1128 pb); canaletas 2 e 6: PCR vetor/vetor (≈ 1500 pb); canaletas 3 e 7: PCR vetor/inserto (≈ 1827 pb) e canaletas 4 e 8: PCR vetor/vetor (≈ 2000 pb).

5.4 Sequenciamento de nucleotídeos do inserto do gene NP do VIA nos clones bacterianos transformantes selecionados

A inserção em fase de leitura do gene NP foi confirmada pelo sequenciamento de nucleotídeos e 99% de identidade foi observada entre a sequência de nucleotídeos do gene clonado da NPr e a sequência depositada no GeneBank A/duck/Czechoslovakia/1956 (H4N6) GU052384 (Figura 6).

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
☐ Influenza A virus (A/duck/Czechoslovakia/1956(H4N6)) segment 5 nucleocapsid protein (NP) gene, complete cds >gb CY130025.1 Influenza A virus (A/duck/Cze	922	1793	99%	0.0	99%	GU052384.1
☐ Influenza A virus (A/duck/Czech Republic/1/1956(H4N6)) segment 5, complete sequence	922	1793	99%	0.0	99%	CY045330.1
☐ Influenza A virus (A/duck/Czechoslovakia/1956(H4N6)) segment 5, complete sequence	922	1793	99%	0.0	99%	CY014650.1
☐ Influenza A virus (A/duck/Czechoslovakia/1956(H4N6)) nucleoprotein, complete cds	917	1771	99%	0.0	99%	M30762.1

Figura 6. Visualização dos “scores” dos parâmetros determinados para as sequências de nucleotídeos sequenciados dos clones A11 e A12 de *E.coli* transformados pelo vetor pET SUMO (INVITROGEN) produzido nesse trabalho, que foram obtidos através da análise pelo programa BLASTn no site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi>, com destaque para os escores de “E-value” e os de identidade de 99% com relação a sequência do gene NP clonada.

O sequenciamento mostrou que o códon iniciador ATG encontra-se na orientação correta de leitura (*in frame*) e na posição *downstream* em relação às sequências do gene promotor e da etiqueta SUMO-Poli-Histidina. O “e-value” obtido no Blast foi de 0.0. Após análise do sequenciamento, o clone A11 foi o escolhido para a realização da extração do DNA plasmidial, seguido de transformação em células competentes de *E. coli* da linhagem BL21. Dos 40 clones transformantes obtidos, um foi escolhido (1/11) para dar prosseguimento à indução da expressão.

5.5 Indução da expressão e purificação da nucleoproteína recombinante (NPr) do VIA e análise pelas técnicas de SDS-PAGE e de Western blotting

O clone 1/11 foi cultivado para a indução da expressão, após adição de IPTG nas concentrações de 0,5 mM e 1 mM, e expressou no extrato solúvel a NP recombinante, no tamanho esperado de aproximadamente 56 kDa, correspondente a 43 kDa da proteína recombinante mais 13 kDa correspondente à etiqueta SUMO-poli-Histidina. Isto foi observado durante toda a cinética da indução da expressão, tanto para a análise por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) (Figura 7), quando para as análises realizadas pela técnica de Western Blotting (Figura 8). As setas na figura indicam a banda correspondente à proteína de interesse fusionada a proteína SUMO, cuja expressão foi positiva após 4, 8, 16 e 24 horas de indução da expressão, nas concentrações de IPTG determinadas. A fim de diminuir incertezas em relação à correta indução da NP recombinante foi analisada também uma fração do extrato da cultura de *E. coli* não submetida à indução da expressão de proteínas com IPTG (canaleta 2), bem como uma fração do extrato da cultura de *E. coli* contendo apenas o vetor pET SUMO sem o inserto gênico da NP do VIA (controle positivo da expressão da “etiqueta” SUMO-PoliHis), nas quais não ocorreram marcações correspondentes a banda da NP recombinante.

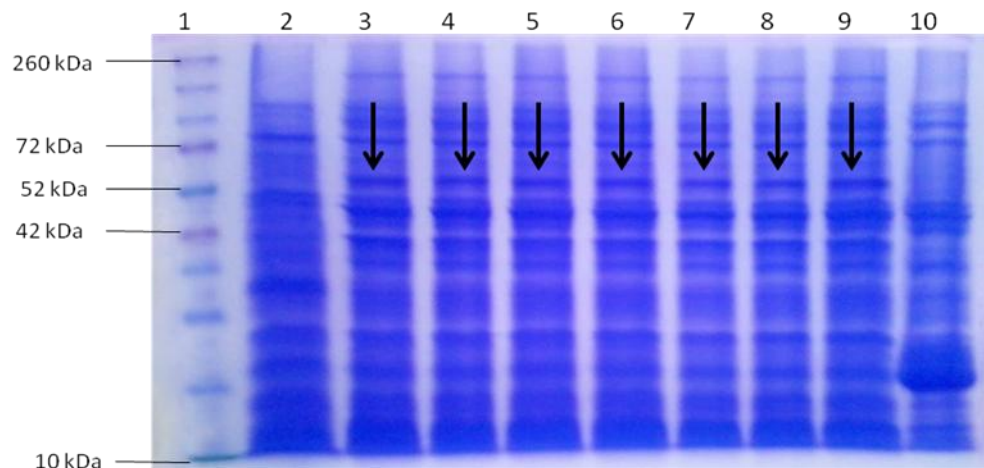


Figura 7. Caracterização por SDS-PAGE da NP recombinante do VIA expressa em *E. coli*. Canaleta 1: marcador de peso molecular; 2: fração do extrato da cultura de *E. coli* não induzida com IPTG; canaletas de 3 a 9: frações solúveis da cinética da indução de expressão, sendo a 3: intervalo de 4h a 0,5mM; 4: intervalo de 4h a 1mM; 5: intervalo de 8h a 0,5mM; 6: intervalo de 8h a 1mM; 7: intervalo de 12h a 0,5mM; 8: intervalo de 12h a 1mM e 9: intervalo de 16h a 1 mM de IPTG; canaleta10: fração do extrato da cultura de *E. coli* contendo apenas o vetor pET SUMO, sem o inserto do gene NP. As setas indicam a proteína NP recombinante do VIA de ~56 kDa.

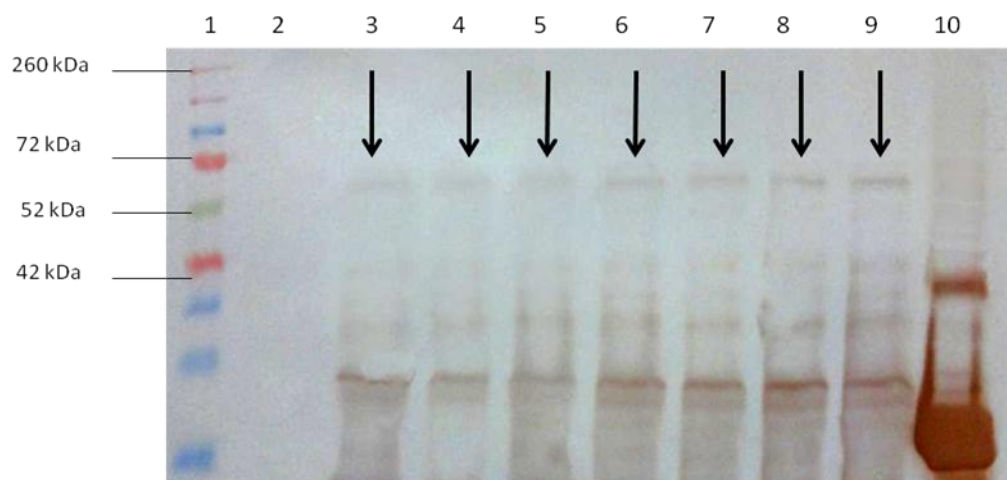


Figura 8. Caracterização por Western blotting da NP recombinante do VIA expressa em *E. coli*. Canaleta 1: marcador de peso molecular; 2: fração do extrato da cultura de *E. coli* não induzida com IPTG; canaletas de 3 a 9: frações solúveis da cinética da indução de expressão, sendo a 3: intervalo de 4h a 0,5mM; 4: intervalo de 4h a 1mM; 5: intervalo de 8h a 0,5mM; 6: intervalo de 8h a 1mM; 7: intervalo de 12h a 0,5mM; 8: intervalo de 12h a 1mM e 9: intervalo de 16h a 1 mM de IPTG; canaleta10: fração do extrato da cultura de *E. coli* contendo apenas o vetor pET SUMO, sem o inserto do gene NP. As setas indicam a proteína NP recombinante do VIA de ~56 kDa.

A análise realizada por Western Blotting dos produtos obtidos após purificação em resina de níquel-agarose da fração solúvel obtida da cultura de *E. coli* da linhagem BL21 submetida à indução da expressão com IPTG (Figura 9) demonstra a presença da proteína recombinante NP na primeira fração eluída com tampão de lavagem da resina com tampão de eluição. O produto obtido da purificação em resina de Níquel-Agarose foi quantificado pelo método de Bradford (1976), no qual se obteve uma concentração de proteína purificada de 1 mg/mL.

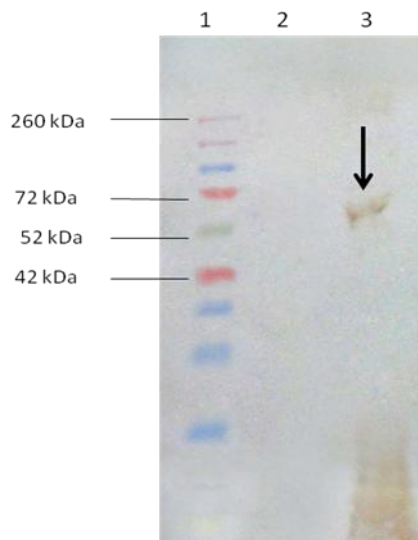


Figura 9. Caracterização por Western blotting da NP recombinante do VIA expressa em *E. coli* após purificação em resina de níquel-agarose. Canaleta 1: marcador de peso molecular; canaleta 2: fração da cultura não induzida; canaleta 3: fração 1 da purificação da NP recombinante do VIA.

A NP é uma proteína altamente conservada que pode ser utilizada como antígeno no diagnóstico da Influenza Aviária. Por causa disso, constam na literatura muitos estudos nos quais o gene da NP do VIA já foi clonado e expresso, com sucesso, em células de levedura *Saccharomyces cerevisiae* (UPADHYAY et al., 2009) e *Pichia pastoris* (ABUBAKAR et al., 2011), em células de insetos transfectadas por vetor constituído de baculovírus (ZHOU et al., 1998; SHAFER et al., 1998), como também em células bacterianas (JIN et al., 2004) e inclusive no sistema *E. coli* utilizando a mesma linhagem bacteriana que foi utilizada neste trabalho porém empregando um vetor de expressão diferente dos vetores do sistema pET (WU et al., 2007; VELUMANI et al., 2008).

O sistema de expressão constituído por células de *E. coli* tem sido o mais empregado para a obtenção de antígenos proteicos recombinantes para uso no diagnóstico sorológico de doenças, principalmente aquelas proteínas que não precisam de modificações pós-traducionais, tais como glicosilação. Isto porque este sistema apresenta inúmeras vantagens, como o crescimento bacteriano acelerado mesmo após o microorganismo ser transformado, por se adequar a uma manipulação relativamente mais simples do que ocorre com outros sistemas de clonagem e expressão, dentre outras características (SINGH; PANDA, 2005; TSUMOTO et al., 2003; PELCZAR, 1996; BROWN, 2003; MICKLOS; FREYER, 2003; SAMBROOK; RUSSEL, 2001; WALSH, 1998).

Embora o emprego dos métodos de expressão de proteínas recombinantes em bactérias como a *E. coli* apresente inúmeras vantagens, é comum a baixa produção e a baixa eficiência na purificação destas proteínas, problemas de conformação e estabilidade, além da expressão da proteína em sua forma insolúvel, dificuldade que leva a problemas durante seu uso como antígeno no imunodiagnóstico. Contudo, há alguns estudos relatando que a incorporação de etiquetas de determinados peptídeos (*tags*), fusionadas à proteína recombinante de interesse, aumenta o rendimento da expressão dessa última, bem como possui influencia na solubilidade da proteína recombinante que está sendo expressa (ZUO et al., 2005).

O vetor de expressão escolhido no desenvolvimento desta pesquisa foi o pET SUMO (Invitrogen®), o qual possui uma etiqueta constituída pelo polipeptídeo SUMO e por uma sequência de poli-histidina N terminal (Life Technologies, 2010). Zuo et al. (2005) demonstraram que, quando utilizada, a proteína SUMO promove uma estabilidade estrutural que facilita a obtenção da proteína desejada em sua forma solúvel além de aumentar seu nível de expressão, principalmente quando a indução da expressão é realizada em meio de cultura rico em nutrientes. A sequência de poli-histidina N terminal é uma sequência de seis histidinas consecutivas que criam um sítio de ligação que se liga ao níquel e outros metais, utilizada posteriormente para a purificação da proteína recombinante através de cromatografia por afinidade (NELSON; COX, 2011; YOUNG et al., 2012).

Dessa forma, de posse da NP recombinante purificada e em sua forma solúvel, prosseguiu-se com a avaliação de sua antigenicidade a fim de constatar se esta proteína recombinante teria características suficientes para ser produzida em maior escala para ser aplicada em técnicas de imunodiagnóstico da IA.

5.6 Avaliação da antigenicidade da NPr

Epítopos são componentes de proteínas que os anticorpos se ligam durante uma resposta imune. A maioria dos epítopos proteicos é constituída por diferentes partes da cadeia polipeptídica, que, na medida em que a proteína se dobra, ficam próximos uns dos outros, sendo denominados de epítopos conformacionais. Em contrapartida, os epítopos lineares são aqueles formados por resíduos de aminoácidos dispostos sequencialmente e, apesar destes terem relevância limitada em relação aos conformacionais durante a resposta imune-humoral, a identificação de tais segmentos peptídicos lineares é, muitas vezes, o primeiro passo na busca de determinantes antigênicos em microorganismos patogênicos. Além disso, uma possível mudança em um aminoácido pode alterar drasticamente a resposta imune em termos de reconhecimento pelo anticorpo (LARSEN et al., 2006).

Os métodos clássicos utilizados para a predição da antigenicidade de proteínas atribuem valores a cada um dos seus aminoácidos, ou sequencias de aminoácidos, baseando-se em características físico-químicas dos mesmos. Este tipo de predição foi desenvolvido pela primeira vez por Hopp e Woods, no ano de 1981. Estes autores criaram um método capaz de avaliar os principais locais de hidrofiliidade, atribuindo um valor numérico a cada aminoácido e posteriormente calculando a média destes valores ao longo da cadeia proteica (HOPP; WOODS, 1981; LARSEN et al., 2006). No presente estudo, a sequência deduzida de aminoácidos da NPr foi analisada por este método, que gerou um gráfico do perfil de hidrofiliidade representado na Figura 10. A Figura 11 exhibe os perfis de hidrofiliidade determinados pelo mesmo método para a sequência de aminoácidos da NP recombinante, representada no gráfico pela cor verde musgo, em relação a outras sequencias da NP do VIA depositadas no GenBank. É possível perceber uma alta similaridade entre estas sequencias, particularmente entre as sequencias da NP

recombinante com as sequencias derivadas dos subtipo H5N1, H7N3 e H1N1 do VIA.

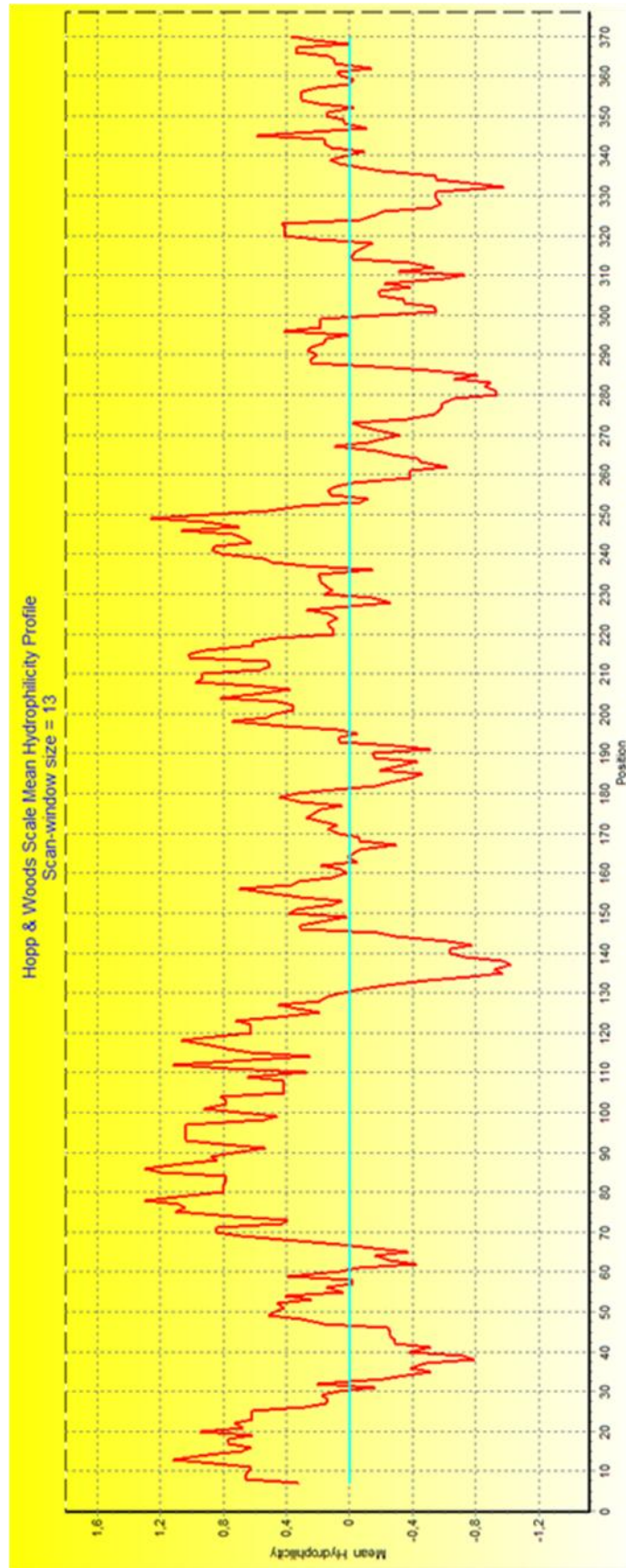


Figura 10. Predição dos epítomos da NPR pelo método de Hopp & Woods. Os picos acima da linha em azul correspondem aos peptídeos que constituíram possíveis epítomos da NPR.

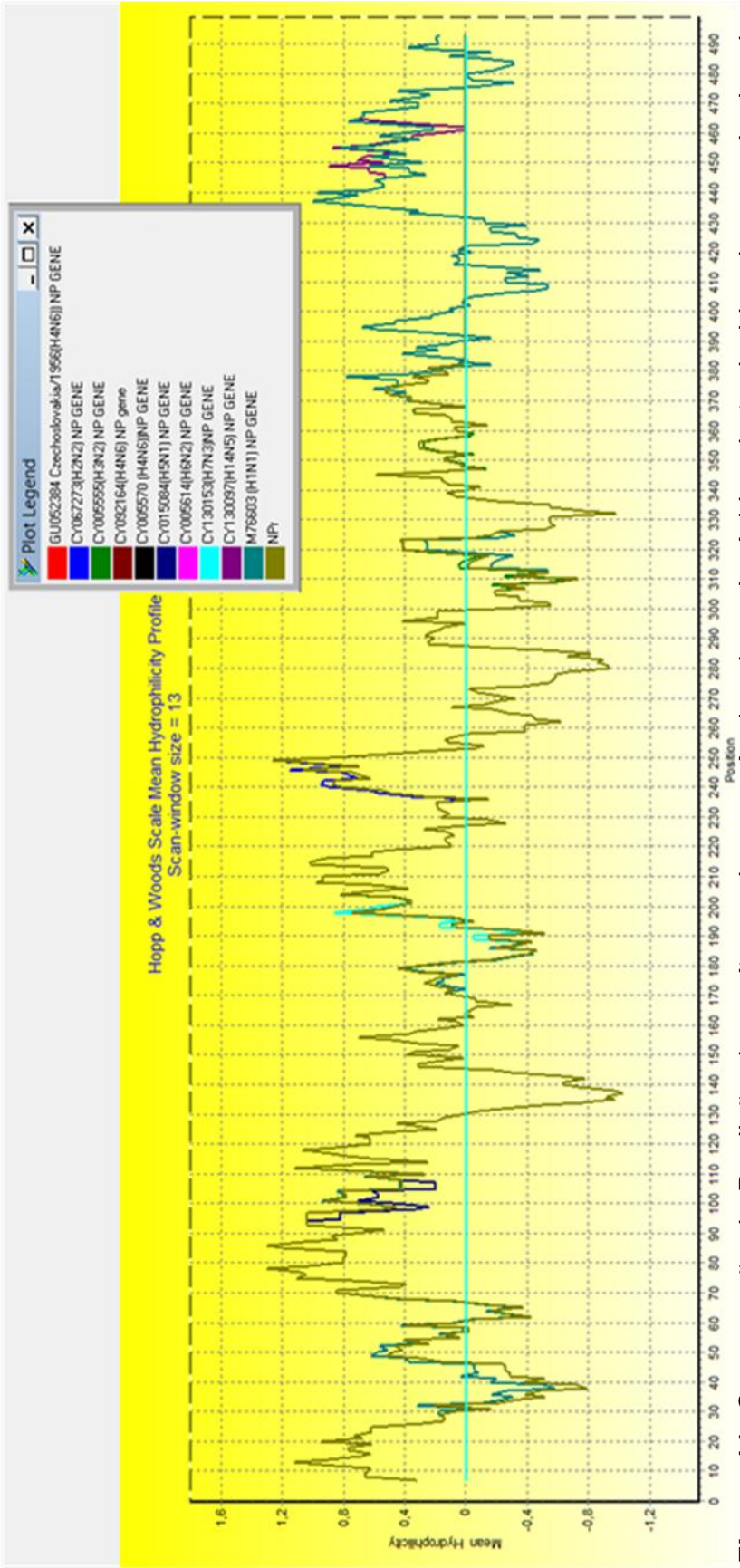


Figura 11. Comparação da Predição dos epítomos das sequências de aminoácidos da traduzidas das sequências de nucleotídeos do geneclonado da NPr com as predições de epítomos de sequências depositadas no GenBank. Cada sequência traduzida de aminoácidos está representada por uma cor.

Outro programa empregado para a predição de epítomos lineares proteicos é o Bepipred Linear Epitope Prediction, desenvolvido por Larsen et al. (2006), o qual avalia outros parâmetros além da hidrofiliidade, tais como flexibilidade, superfície de exposição e polaridade dos peptídeos. A Figura 12 apresenta a predição de epítomos (picos corados em amarelo) por este método. Nota-se que o perfil gerado demonstrou certa correspondência ao gerado pelo método anterior. Além do gráfico, o programa fornece as sequencias de aminoácidos, posições e tamanhos dos epítomos preditos, descritos na Tabela 1.

Estas sequências de aminoácidos detalhadas na Tabela 1, constituem epítomos lineares previstos na NPr. O interessante é que alguns desses epítomos foram reconhecidos por anticorpos monoclonais específicos e pelos linfócitos T-citotóxicos, cuja resposta contra a NP pode proporcionar parte da proteção imune contra o VIA (VARICH et al., 2014). Além disso, o conhecimento dos epítomos da NP do VIA e a produção de anticorpos monoclonais específicos contra essa proteína pode desempenhar um papel importante no diagnóstico da Influenza Aviária, especialmente quando novas variantes antigênicas emergem e kits de diagnóstico ainda não estão disponíveis (YANG et al., 2008).

Bepipred Linear Epitope Prediction

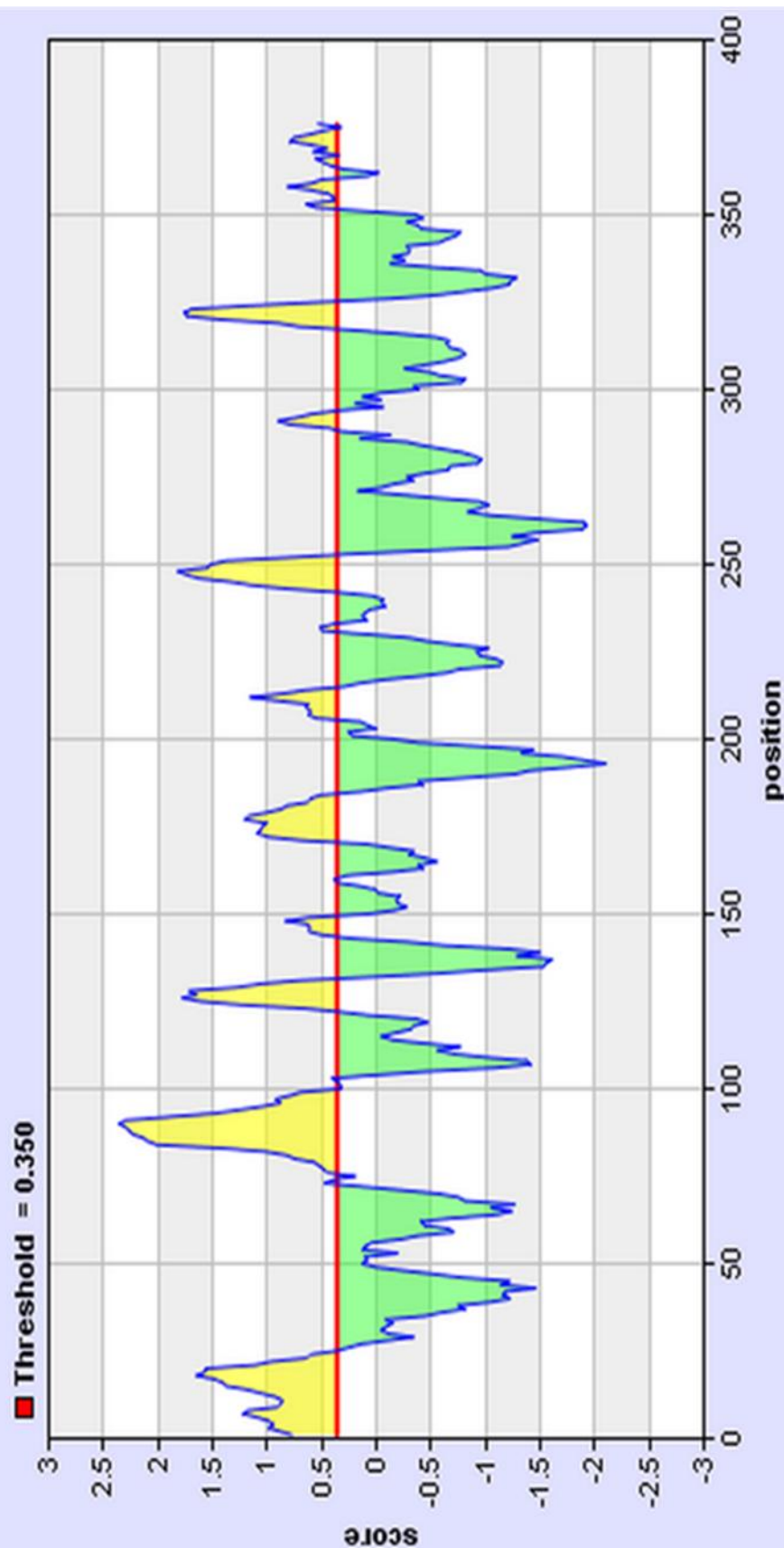


Figura 12. Predição dos epítopos da NPr pelo método Bepipred Linear Epitope Prediction. Os picos corados em amarelo correspondem aos peptídeos que constituem possíveis epítopos da NPr.

Tabela 1. Posições e tamanhos dos 15 epítomos da NPr preditos pelo método Bepipred Linear Epitope Prediction.

No.	Início	Fim	Peptídeo	Tamanho
1	1	25	MASQGTKRSYEQMETGGERQNATEI	25
2	73	74	ER	2
3	76	99	NKYLEEHPSAGKDPKKTGGPIYRR	24
4	102	103	GK	2
5	123	131	ANNGEDATA	9
6	144	149	NDATYQ	6
7	159	160	MD	2
8	171	184	TLPRRSGAAGAAVK	14
9	206	214	FWRGENGRR	9
10	231	233	QTA	3
11	243	252	RESRNPNGNAE	10
12	289	293	YDFER	5
13	318	325	PNENPAHK	8
14	352	360	VVPRGQLST	9
15	364	374	QIASNENMEAM	11

Varich e Kaverin (2004) verificaram, após análise por radioimunoabsorção e imunoblotting, utilizando um painel de anticorpos monoclonais anti-NP, que os resíduos de aminoácidos 290 e 353 da NP participam da formação de importantes epítomos da NP. Além disso, Yang et al. (2008) produziu anticorpos monoclonais capazes de reconhecer epítomos da proteína na posição dos aminoácidos 71 a 96 em testes de ELISA. Tais resíduos de aminoácidos foram também mapeados nos epítomos que foram previstos para a NPr expressa nesse estudo, após análise de predição pelo *Bepipred Linear Epitope Prediction* (Figura 12 e Tabela 1). Ademais, as análises de bioinformática pelos métodos de Hopp & Woods revelaram que a sequência deduzida de aminoácidos da NPr apresentou alta similaridade de antigenicidade em relação as sequências deduzidas de aminoácidos da NP de outras estirpes do VIA depositadas no GenBank, tais como aquelas classificadas nos subtipos H5N1 e H1N1. Dessa forma, de um total de 16 epítomos encontrados na NP do VIA, a NPr expressa nesse estudo possui 15 epítomos, o que confirma a conservação da maior parte das propriedades antigênicas dessa proteína recombinante em comparação com a proteína homóloga do VIA. Essa inferência é respaldada, tanto pela análise bioinformática quanto pelos resultados das análises nas técnicas de Western blotting e ELISA.

5.7 Desenvolvimento do Elisa Indireto com a NPr expressada em *E. coli*

O teste NPr-VIA-ELISA foi padronizado a partir de uma titulação em bloco, colocando-se para reagir quatro concentrações da NPr (2, 4, 8 e 16 µg/mL), previamente adsorvidas às cavidades da microplaca com diferentes diluições dos soros de galinha positivo e negativo de referência para o VIA, abrangendo desde a diluição 1:50 até 1:1600.

A titulação revelou que o soro de referência positivo anti-VIA reagiu com a NPr no NPr-VIA-ELISA ($0,112 \leq DOs \leq 2,09$) enquanto o soro negativo apresentou baixa reatividade no teste ($0,062 \leq DOs \leq 0,261$), gerando um perfil de dose-resposta (Figura 13), no qual fica claro que os valores de densidade óptica foram maiores para as maiores concentrações de antígeno recombinante como também para as menores diluições do soro positivo de referência para o VIA, tornando então possível a diferenciação apropriada entre os dois tipos de soros em todas as suas diluições e todas as concentrações de proteína testadas.

A partir da titulação, a concentração de 8µg/ml de NPr e a diluição de 1:100 dos soros foram escolhidas para posterior análise dos soros teste visto que promoveram uma boa diferenciação entre a amostra de referência positiva da amostra negativa. O valor do ponto de corte (0,125) foi estabelecido como a média das DOs de 10 soros negativos acrescida de 3 vezes o desvio padrão.

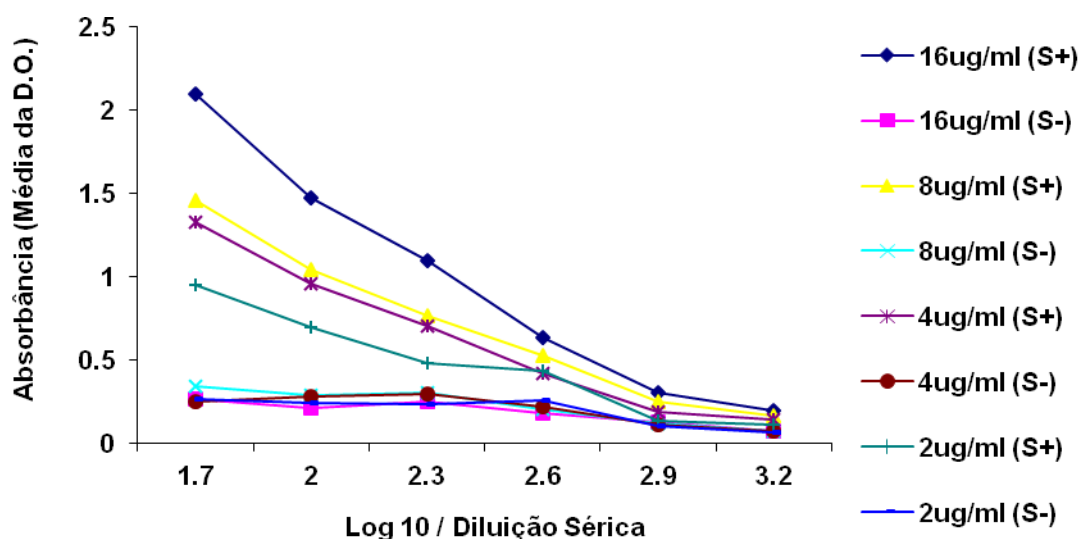


Figura 13. Resultado da titulação pelo método indireto de ELISA de diferentes concentrações da proteína NPr do VIA contra diferentes diluições de soros de galinha de referência positiva (S+) e negativa (S-) para o VIA.

5.8 Análise comparativa entre os testes NPr-VIA-ELISA e IDEXX AI AB TEST

A detecção de anticorpos anti-VIA em um conjunto de soros fornecidos pelo Lanagro/SP pelo teste NPr-VIA-ELISA foi comparada com o teste comercial IDEXX AI Ab Test que foi realizado pelo Lanagro/SP para o mesmo conjunto de amostras. Os resultados estão expressos na Tabela 2 sendo que os valores de sensibilidade, especificidade e acurácia foram de 95%, 97% e 96.7%, respectivamente e a concordância pelo índice k foi de 0.85, indicando muito boa concordância entre os dois testes de ELISA aqui analisados.

De um total de 121 soros, 19 foram classificados como positivos para a presença de anticorpos anti-AIV em ambos os testes (NPr-ELISA e teste comercial de ELISA) e 98 revelaram resultados concordantes negativos quanto à presença de anticorpos para esse mesmo vírus. Foram encontrados alguns resultados discordantes, isto é, três soros foram classificados como positivos somente pelo teste NPr-VIA-ELISA e um soro considerado positivo somente pelo teste comercial de ELISA.

Tabela 2. Comparação entre o teste NPr-VIA-ELISA e o teste IDEXX AI Ab Test realizado pelo LANAGRO/SP, para a detecção dos anticorpos anti-VIA presentes em amostras testes de soro de galinha.

NPr-VIA-ELISA	IDEXX AI Ab Test		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	19	3	22
Negativo	1	98	99
Total	20	101	121

*Sensibilidade = 95.0%; Especificidade = 97.0%; Acurácia = 96.7%; Concordância (Índice Kappa) = 0.88 do NPr-VIA-ELISA em comparação com o IDEXX AI Ab Test.

Os valores de sensibilidade (95%), especificidade (97%) e acurácia (96.7%) obtidos pelo NPr-VIA-ELISA são muito similares aos observados em outros estudos que fizeram uso da NP recombinante expressa em leveduras (*S. cerevisiae*) no teste ELISA indireto, tal como aquele conduzido por Upadhyay et al. (2009), no qual obteve-se 98% de sensibilidade e 97% de especificidade em comparação com o kit comercial ProFlok Plus Test (Symbiotics). Em contrapartida, neste mesmo trabalho, foi utilizada uma concentração dez vezes maior (80 µg/mL) de proteína recombinante para revestir as cavidades da microplaca de ELISA. Ademais, Wu et al. (2007) compararam os resultados do ELISA indireto por eles desenvolvido com os testes de HI, AGID e o kit comercial IDEXX-FlockChek, obtendo uma concordância de 92%, 83,3% e 96,2%, respectivamente, entretanto, esses autores fizeram uso de 50 µg/mL da NP recombinante.

Por sua vez, Jin et al. (2004) expressaram no sistema *E. coli* o segmento do aminoácido 47 ao 384 da NP do subtipo H5N1 do VIA e o aplicaram no teste indireto de ELISA, avaliando 150 amostras de soro de aves infectadas experimentalmente e confrontando os resultados com os obtidos pelo teste HI e pelo mesmo kit de ELISA comercial analisado por Wu et al. (2007), o IDEXX FlockChek. Os resultados alcançaram 82% de concordância com o teste HI e 80,67% com o kit comercial. Um segundo conjunto de amostras, composto por 448 soros de aves doentes e galinhas vacinadas durante o surto de 2003-2004 na China, foi avaliado pelos mesmos autores através dos dois testes de ELISA anteriormente aplicados. Nesta segunda avaliação, os autores obtiveram 95% de concordância entre o ELISA desenvolvido para detecção da NP recombinante e o kit comercial. Nas duas avaliações

realizadas, foram empregadas para revestir as placas de ELISA concentrações maiores de NP recombinante para revestir as cavidades da microplaca, isto é, 400 ou 50 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente nos estudos de Jin et al. (2004) e de Wu et al. (2007) do que a concentração ideal que foi utilizada no presente estudo (8 $\mu\text{g/mL}$). Provavelmente esses resultados ocorreram porque esses autores obtiveram as NP recombinantes na fração insolúvel e tiveram que usar outros processos, inclusive com maior risco de ocorrer denaturação dessas proteínas e mudanças na antigenicidade das mesmas.

Em face dos resultados obtidos no presente estudo, há evidências de que o teste NPr-VIA-ELISA por nós desenvolvido tem potencial para ser usado de forma bem sucedida no imunodiagnóstico da infecção pelo VIA, e pode-se inferir que houve conservação da maior parte dos epítomos lineares na NPr aqui expressa, os quais são imprescindíveis para a interação antígeno-anticorpo que ocorre no ensaio imuno-enzimático e, portanto, para detectar com maior sensibilidade e especificidade os anticorpos de galinhas contra o AIV. Entretanto, é preciso lembrar que os epítomos conformacionais também participam desta interação, visto que a NPr não sofreu nenhum processo de desnaturação durante a aplicação do ELISA. Assim, pode-se prever também que, ao expressar os 498 aminoácidos que compõem a NP do VIA (PORTELA; DIGARD, 2002) e, desta forma, obter uma proteína recombinante com a presença de todos os seus epítomos antigênicos, o teste NPr-VIA-ELISA atingirá valores ainda maiores de sensibilidade, especificidade, acurácia e índice de concordância em comparação com o IDEXX AI Ab Test, assim como com outros kits comerciais para o sorodiagnóstico da Influenza Aviária

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos apontam que os procedimentos de clonagem e expressão da NPr parcial do VIA desenvolvidos neste estudo proporcionaram a produção da NP recombinante sob a forma solúvel que, como um dos antígenos importantes do VIA, está composto pela maioria dos epítomos indispensáveis para a reação antígeno-anticorpo, de forma que isso pode ter contribuído para que o teste sorológico desenvolvido com essa mesma proteína recombinante como antígeno alvo, o ensaio de NPr-VIA-ELISA, fosse capaz de detectar as amostras de soros positivos para o VIA, discriminando-as das amostras de soros negativas para esse mesmo vírus e apresentando uma performance muito similar com o teste comercial de ELISA que utiliza preparação purificada de partículas do VIA como antígeno adsorvido à fase sólida. Dessa maneira, ficou evidenciado que o teste NPr-VIA-ELISA constitui-se em uma alternativa rápida, sensível, específica e capaz de avaliar de forma prática amostras de soros de aves comerciais para o sorodiagnóstico da Influenza Aviária.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUBAKAR, M. B.; AINI, I.; OMAR, A. R.; HAIR-BEJO, M. Cloning and expression of highly pathogenic avian influenza virus full-length nonstructural gene in *Pichia pastoris*. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, Bethesda, v. 2011, p. 1-5, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2011/414198>>.

ALEXANDER, D. J. A review of avian influenza in different birds species. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 7, n. 1-2, p. 3-13, 2000.

ALEXANDER, D. J. Newcastle disease, other avian Paramyxoviruses and pneumovirus infections: Newcastle disease. In: SAIF, Y. M. (Ed.). **Diseases of poultry**. Ames: Iowa State University Press, 2003. p. 64–87.

AUERBACH, P.; OSELAME, G. B.; DUTRA, D. A. Revisão histórica da gripe no mundo e a nova H7N9. **Revista de Medicina e Saúde de Brasília**, Brasília, v. 2, n. 3, p. 183-197, 2003.

BELUSSO, D.; HESPANHOL, A. N. A evolução da avicultura industrial brasileira e seus efeitos territoriais. **Revista Percursos – NEMO**, Maringá, v. 2, n. 1, p. 25-51, 2010.

BERCHIERI Jr, A.; MACARI, M. **Doenças das aves**. Campinas: FACTA – Fundação APINCO de Ciências e Tecnologia Avícolas, 2000. p. 283-289.

BLAAS, D.; PATZELT, E.; KUECHLER, E. Cap-recognizing protein of influenza virus. **Virology**, Amsterdam, v. 116, n. 1, p. 339-348, 1982. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/0042-6822\(82\)90425-1](http://dx.doi.org/10.1016/0042-6822(82)90425-1)>.

BOSCH, F. X.; GARTEN, W.; KLENK, H. D.; ROTT, R. Proteolytic cleavage of influenza virus hemagglutinins: primary structure of the connecting peptide between ha₁ and ha₂ determines proteolytic cleavability and pathogenicity of avian influenza viruses. **Virology**, Amsterdam, v. 113, n. 2, p. 725-735, 1981. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/0042-6822\(81\)90201-4](http://dx.doi.org/10.1016/0042-6822(81)90201-4)>.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)>.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de vigilância epidemiológica**. 6. ed. Brasília, 2005. 816 p. (Série A Normas e Manuais Técnicos).

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento - MAPA. **Programa Nacional de Sanidade Avícola. Plano de contingência para influenza aviária e doença de Newcastle**. Brasília, 2009. 62 p.

BREIER, A. **Cobertura e foco da campanha de vacinação contra o vírus influenza**: estudo transversal de base populacional. 2005. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2005.

BRENTANO, L. **Técnicas moleculares de diagnóstico** - avanços em técnicas moleculares de diagnóstico. 2011. Disponível em <<http://pt.engormix.com/MAavicultura/saude/artigos/avancos-tecnicas-moleculares-diagnostico-t608/165p0.htm>>. Acesso em: 09 set. 2013.

BROWN, T. A. **Clonagem gênica e análise de DNA**: uma introdução. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2003. 376 p.

CAPUA, I.; ALEXANDER, D. J. Avian influenza and human health. **Acta Tropica**, Amsterdam, v. 83, p. 1-6, 2002.

CARON, L. F.; THOMAZ-SOCCOL, V. T. Threat of an Influenza Panzooty: a review based on conservation medicine. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 52, n. 4, p. 863-873, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1516-89132009000400010>>.

CATTOLI, G.; TERREGINO, C. New perspectives in avian influenza diagnosis. **Zoonoses and Public Health**, Oxford, v. 55, n. 1, p. 24-28, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1863-2378.2007.01085.x>>.

CATTOLI, G.; MILANI, A.; BETTINI, F.; BEATO, M. S.; MANCIN, M.; TERREGINO, C.; CAPUA, I. Development and validation of an anti-N3 indirect immunofluorescent antibody test to be used as a companion diagnostic test in the framework of a "DIVA" vaccination strategy for avian influenza infections in poultry. **Avian Pathology**, Abingdon, v. 35, n. 2, p. 154-159, 2006.

CHEN, R.; HOLMES, E. C. Avian Influenza Virus exhibits rapid evolutionary dynamics. **Molecular Biology and Evolution**, Lawrence, v. 23, n. 12, p. 2336-2341, 2006.

CIACII-ZANELLA, J. R.; VINCENT, A. L.; PRICKETT, J. R.; ZIMMERMAN, S. M.; ZIMMERMAN, J. J. Detection of anti-influenza A nucleoprotein antibodies in pig using a commercial influenza epitope-blocking enzym-linked immunosorbent assay developed for avian species. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 22, p. 3-9, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1177/104063871002200102>>.

COX, N. J.; SUBBARAO, K. Global epidemiology of influenza: Past and Present. **Annual Review of Medicine**, Stanford, v. 51, p. 407-421, 2000.

DAS A.; SPACKMAN E.; SENNE D.; PEDERSEN J.; SUAREZ D. L. Development of an internal positive control for rapid diagnosis of avian influenza virus infections by real-time reverse transcription-PCR with lyophilized reagents. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 44, n. 9, p. 3065-3073, 2006.

DE BOER, G. F.; BACK, W.; OSTERHAUS, A. D. An ELISA for detection of antibodies against influenza A nucleoprotein in humans and various animal species. **Archives of Virology**, New York, v. 115, n. 1-2, p. 47-61, 1990.

EASTERDAY, B. C.; HINSHAW, V. S.; HALVORSON, D. A. Influenza. In: CALNEK, B. W. (Ed.). **Diseases of poultry**. 10. ed. Ames: Iowa State University Press, 1997. p. 583-605.

FAO. Food and Agriculture Organization. **Epidemiology of avian influenza**. Disponível em: <<http://www.fao.org/avianflu/en/clinical.html>>. Acesso em: 02 ago. 2013.

FRANCO, L. Impacto da Influenza pelo mundo serve de exemplo. **O presente Rural**, Marechal Cândido Rondon, Paraná, p. 8-11, fev-mar. 2015.

GALL A.; HOFFMANN B.; HARDER T.C.; GRUND C.; BEER M. Universal primer set for amplification and sequencing of HA0 cleavage sites of all influenza A viruses. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 46, p. 2561–2567, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00466-08>>

GALL, A.; HOFFMANN, B.; HARDER, T.C.; GRUND, C.; EHRLICH, R.; BEER M. Rapid and highly sensitive neuraminidase subtyping of avian influenza viruses by use of a diagnostic DNA microarray. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 47, p. 2985–2988, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00850-09>>.

GONÇALVES, M. C. M.; GIBERTONI, A. M.; MONTASSIER, M. F.; FERNANDES, C. C.; MONTASSIER, H. J. Clonagem e expressão do gene da glicoproteína S1 do Vírus da bronquite infecciosa das galinhas em *Pichia pastoris*. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 77, n. 4, p. 609-615, 2010.

GONZALES, S.; ORTIN, J. Characterization on influenza virus PB1 protein binding to viral RNA: two separate regions of the protein contribute to the interaction domain. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 73, n. 194, p. 631-637, 1999.

GORMAN, O. T.; BEAN, W. J.; KAWAOKA, Y.; WEBSTER, R. G. Evolution of the nucleoprotein gene of influenza A virus. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 64, n. 4, p. 1487-1497, 1990.

HANAHAN, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Journal Molecular Biology**, London, v. 166, n. 4, p. 557-580, 1983. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0022-2836\(83\)80284-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-2836(83)80284-8)>.

HILLEMAN, M. R. Realities and enigmas of human viral influenza: pathogenesis, epidemiology and control. **Vaccine**, Amsterdam, v. 20, n. 25-26, p. 3068-3087, 2002.

HOOP, T. P.; WOODS, K. R. Prediction protein antigenic determinants from amino acid sequences. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 78, n. 6, p. 3824-3828, 1981.

IBIAPINA, C. C.; COSTA, G. A.; FARIA, A. C. Influenza A aviária (H5N1) – a gripe do frango. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, Sao Paulo, v. 31, n. 5. 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1806-37132005000500012>>.

JENSEN, T. H.; AJJOURI, G.; HANDBERG, K. J.; SLOMKA, M. J.; COWARD, V. J.; CHERBONNEL, M.; JESTIN, V.; LIND, P.; JOGENSEN, P. H. An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of avian influenza virus subtypes H5 and H7 antibodies. **Acta Veterinaria Scandinavica**, London, v. 55, n. 84, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/1751-0147-55-84>>.

JIN, M.; WANG, G.; ZHANG, R.; ZHAO, S.; LI, H.; TAN, Y.; CHEN, H. Development of enzyme-linked immunosorbent assay with nucleoprotein as antigen for detection of antibodies to avian influenza virus. **Avian Disease**, Kennet Square, v. 48, n. 4, p. 870-878, 2004.

LANDIS, J. R.; KOCH, G. G. An application of hierarchical kappa-type statistics in the assessment of majority agreement among multiple observers. **Biometrics**, New York, v. 33, n. 2, p. 363-374, 1977.

LARSEN, J. E. P.; LUND, O.; NIELSEN, M. Improved method for predicting linear B-cell epitopes. **Immunome Research**, London, v. 2, n. 2, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/1745-7580-2-2>>.

LEE, C-W.; SAIF, Y. M. Avian influenza virus. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Disease**, London, v. 32, p. 301–310, 2009.

LI, Z.; WATANABE, T.; HATTA, M.; WATANABE, S.; NANBO, A.; OZAWA, M.; KAKUGAWA, S.; SHIMOJIMA, M.; YAMADA, S.; NEUMANN, G.; KAWAOKA, Y. Mutational analysis of conserved amino acids in the influenza A virus nucleoprotein. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 83, n. 9, p. 4153–4162, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1128/JVI.02642-08>>.

LIFE TECHNOLOGIES. **Champion™ pET SUMO Protein Expression System**: for high-level expression and enhanced solubility of recombinant proteins in *E. coli* and cleavage of native protein - catalog no. K300-01. (Manual part no. 25-0709). 2010. Disponível em: <https://classes.soe.ucsc.edu/bme220I/Spring11/Reading/petsumo_man.pdf>.

LUPIANI, B.; REDDY, S. M. The history of avian influenza. **Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases**, New York, v. 32, n. 4, p. 311–323, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cimid.2008.01.004>>.

MAKRIDES, S. C. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 60, n. 3, p. 512-538, 1996.

MAPA. Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Plano de contingência para Influenza Aviária e Doença de Newcastle**: versão 1.3. Julho, 2009. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Aniamal/programa%20nacional%20sanidade%20avicola/pano%20de%20contingencia.pdf>. Acesso em: 12 jan. 2014.

MARTINS, N. R. S. Influenza aviária: uma revisão dos últimos dez anos. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, v. 3, n. 2, 2001. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1516-635X2001000200001>>.

MICKLOS, D. A.; FREYER, G. A. **DNA science**: a first course. 2. ed. Cold Spring Harbor: Laboratory Press, 2003. 575 p.

MIERS, L. A.; BANKOWSKI, R. A.; ZEE, Y. C. Optimizing the enzyme-linked immunosorbent assay for evaluating immunity of chickens to Newcastle disease. **Avian Disease**, Kennet Square, v. 27, n. 4, p. 1112-1125, 1994.

MORAES, H. L. S.; SALLE, C. T. P. Influenza aviária. In: CONSELHOS REGIONAIS DE MEDICINA VETERINÁRIA DO PARANÁ (Org.). **Manual de zoonoses**. Curitiba, 2009. v. 1, p. 46-55.

MORAES, H. L. S.; SALLE, C. T. P.; CARON, W. P. Doença das aves. In: **Influenza Aviária**. 2. ed. Campinas: Facta, 2009. 17 p.

MURPHY, B. R.; WEBSTER, R. G. Orthomyxoviruses. In: HOWLEY, P. M. (Ed.). **Fields virology**. 3rd. ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996. p. 1397-1445, 1996.

NCBI National Center for Biotechnology Information. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>> Acesso em: 20 fev. 2012.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger**: princípios da bioquímica. 5. ed. São Paulo: Sarvier, 2011. 1273 p.

NICHOLSON, K. G. Human influenza. In: NICHOLSON, K. G.; WEBSTER, R. G.; HAY, A. J. (Ed.). **Text book of influenza**. London: Blackwell Science, 1998. p. 219-264.

OIE. World Organization for Animal Health. **Terrestrial animal health code**. Avian Influenza. 2014.chapt. 2.3.4.

OLIVEIRA, E. S.; SILVA, K. R.; FERNANDO, F. S.; GONÇALVES, M. C.; FERNANDES, C. C.; BORZI, M. M.; DOS SANTOS, R. M.; TAMANINI, M. L.; MONTASSIER, M. F.; MONTASSIER, H. J. A liquid-phase-blocking concanavalin A enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies against Newcastle disease virus in serum of free-ranging pigeons. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 25, n. 6, p. 720-726, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1177/1040638713503656>>.

PAIVA, L. J. M.; OLIVEIRA, L. R.; AIRES, W. O.; PEREIRA, R. E. P. Influenza Aviária. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Garça, v. 7, n. 12, jan. 2009. Disponível em: <http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/SEay6rMxZO51tAq_2013-6-21-11-45-53.pdf>.

PALESE, P.; SHAW, M. L. Orthomyxoviridae: the viruses and their replication. In: FIELDS, N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Ed.). **Fields virology**. 5th. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. p. 1647-1689.

PANIGRAHY, B.; SENNE, D. A.; PEDERSEN, J. C. Avian influenza virus subtypes inside and outside the live bird markets, 1993–2000: a spatial and temporal relationship. **Avian Diseases**, Kennet Square, v. 46, n. 2, p. 298–307, 2002.

PELCZAR JR., M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia**: conceitos e aplicações. 2. ed. São Paulo: Makron Books, 1996. v. 2.

PELZEL, A. M.; MCCLUSKEY, B. J.; SCOTT, A. E. Review of the highly pathogenic avian influenza outbreak in Texas. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, Schaumburg, v. 228, n. 12, p. 1869–1875, 2006.

PEPIN, K. M.; WANG, J.; WEBB, C. T.; SMITH, G. J. D.; POSS, M.; HUDSON, P. J.; HONG, W.; ZHU, H.; RILEY, S.; GUAN, Y. Multiannual patterns of influenza A transmission in Chinese live-bird market systems. **Influenza Other Respiratory Viruses**, Oxford, v. 7, n. 1, p. 97–107, 2013.

PIELAK, R. M.; CHOUA, J. J. Kinetic analysis of the M2 proton conduction of the influenza virus. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 132, n. 50, p. 17695–17697, 2010.

PORTELA, A.; DIGARD, P. The influenza virus nucleoprotein: a multifunctional RNA-binding protein pivotal to virus replication. **The Journal of General Virology**, London, v. 83, pt. 4, p. 723–734, 2002.

POSTEL, A.; LETZEL, T.; FRISCHMANN, S.; GRUND, C.; BEER, M.; HARDER, T. Evaluation of two commercial loop mediated isothermal amplification assays for detection of avian influenza H5 and H7 hemagglutinin genes. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Lawrence, v. 22, n. 1, p. 61–66, 2010.

RIVETZ, B.; WEISMAN, Y.; RITTERBAND, M.; FISH, F.; HERZBERG, M. Evaluation of a novel rapid kit for the visual detection of Newcastle disease virus antibodies. **Avian Disease**, Kennet Square, v. 29, n. 4, p. 929–942, 1985.

RUPLEY, A. E. **Manual de clínica aviária**. São Paulo: Roca, 1999. 295 p.

SÁ E SILVA, M.; RISSE, D. R.; PANTIN-JACKWOOD, M.; SWAYNE, D. E. High-pathogenicity Avian Influenza Virus in the reproductive tract of chickens. **Veterinary Pathology**, New York, v. 50, n. 6, p. 956–960, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1177/0300985813490755>>.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 3. ed. Cold Spring Harbor: Laboratory Press, 2001. 3 v.

SANTOS, B. M.; FARIA, J. E.; RIBEIRO, V. V. **Doenças virais de importância nas aves**. Viçosa: UFV, 2000. p. 31-35.

SCHROEDER, C.; FORD, C. F.; WHARTON, S. A.; HAY, A. J. Functional reconstitution in lipid vesicles of influenza virus M2 protein expressed by baculovirus: evidence for proton transfer activity. **Journal of General Virology**, London, v. 75, p. 3477-3484, 1994.

SHAFFER, A. L.; KATZ, J. B.; EERNISSE, K. A. Development and validation of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of type A influenza antibodies in avian sera. **Avian Diseases**, Kennet Square, v. 42, n. 1, p. 28–34, 1998.

SHU, L. L.; BEAN, W. J.; WEBSTER, R. G. Analysis of the evolution and variation of the human influenza A virus nucleoprotein gene from 1933 to 1990. **Journal Virology**, London, v. 67, n. 5, p. 2723–2729, 1993.

SILVA, K. R.; GOLÇALVES, M. C. M.; OLIVEIRA, E. S., FERNANDO, F. S.; MONTASSIER, M. F. S.; FERNANDES, C. C., TAMANINE, M. L. F.; BORZI, M. M.; SANTOS, R. M.; MENDONÇA, A. O.; REISCHACK, D.; PAULILLO, A. C., MONTASSIER, H. J. Cloning and Expression of the Nucleoprotein Gene (NP) of Newcastle Disease Virus (NDV) in Escherichia coli for immunodiagnosis application. **International Journal Poultry Science**, Faisalabad, v. 13, n. 8, p. 473-479, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/0.3923/ijps.2014.473.479>>.

SIMMS, L.; JEGGO, M. Avian Influenza from an ecohealth perspective. **EcoHealth**, New York, v. 11, n. 1, p. 4–14, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10393-014-0927-x>>.

SINGH, S. M.; PANDA, A. K. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 99, n. 4, p. 303-310, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1263/jbb.99.303>>.

SPACKMAN, E. **Avian Influenza Virus**. Athens: Human Press, 2008. (Methods in Molecular Biology, 436).

SPACKMAN, E.; SENNE, D.; MYERS, T.; BULAGA, L.; GARBER, L.; PERDUE, M.; LOHMAN, K.; DAUM, L.; SUAREZ, L. Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 40, n. 9, p. 3256-3260, 2002. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.40.9.3256-3260.2002>>.

SUAREZ, D. L.; DAS, A.; ELLIS, E. Review of rapid molecular diagnostic tools for avian influenza vírus. **Avian Disease**, Kennet Square, v. 51, suppl. 1, p. 201-208, 2007.

SULLIVAN, H. J.; BLITVICH, B. J.; VANDALEN, K.; BENTLER, K. T.; FRANKLIN, A. B.; ROOT, J. J. Evaluation of an epitope-blocking enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies to influenza A virus in domestic and wild avian and mammalian species. **Journal of Virological Methods**, v. 161, n. 1, p. 141-146, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2009.06.001>>.

SWAYNE, D. E.; HALVORSON, D. A. Influenza. In: SAIF, Y. M. (Ed.). **Diseases of poultry**. 11. ed. Ames: Iowa State Press, 2003. p. 135-160.

TAVARES, L. P.; RIBEIRO, K. C. S. Desenvolvimento da avicultura de corte brasileira e perspectivas frente à Influenza Aviária. **Organizações Rurais & Agroindustriais**, Lavras, v. 9, n. 1, p. 79-88, 2007.

TESSARI, E. N. C. **Importância do monitoramento sorológico na avicultura**. 2011. Disponível em: <http://www.biologico.sp.gov.br/artigos_ok.php?id_artigo=162>. Acesso em: 11 jan. 2015.

TOWBIN, H. T.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Eletrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: produce and some applications. **Proceedings National Academy of Sciences USA**, Washington, v. 76, n. 9, p. 4350-4354, 1979.

TSUMOTO, K.; UMETSU, M.; KUMAGAI, I.; EJIMA, D.; ARAKAWA, T. Solubilization of active green fluorescent protein from insoluble particles by guanidine and arginine. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Amsterdam, v. 312, n. 4, p. 1383-1386, 2003. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.11.055>>.

UBABEF. União Brasileira de Avicultura. **História da avicultura no Brasil**. Disponível em: <http://www.ubabef.com.br/a_avicultura_brasileira/historia_da_avicultura_no_brasil>. Acesso em: 23 out. 2013.

UPADHYAY, C.; AMMAYAPPAN, A.; VAKHARIA, V. N. Detection of NP, N3 and N7 antibodies to avian influenza virus by indirect ELISA using yeast expressed antigens. **Journal Virology**, London, v. 6, p. 158-167, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/1743-422X-6-158>>.

VARICH, N. L.; KAVERIN, N. V. Antigenically relevant amino acid positions as revealed in reactions of monoclonal antibodies with the nucleoproteins of closely related influenza A virus strains. **Archives of Virology**, New York, v. 149, p. 2271–2276, 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00705-004-0359-y>>.

VARICH, N. L.; SADYKOVA, G. K.; PRILIPOV, A. G.; KOCHERGIN-NIKITSKY, K. S.; WEBSTER, R. G.; KAVERIN, N. V. Location and architecture of an antibody-binding site of influenza A virus nucleoprotein. **Archives of Virology**, New York, v. 159, n. 6, p. 1493-1497, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00705-013-1952-8>>.

VELUMANI, S.; DU, Q.; FENNER, B. J.; PRABAKARAN, M.; WEE, L. C.; NUO, L. Y.; KWANG, J. Development of an antigen-capture ELISA for detection of H7 subtype avian influenza from experimentally infected chickens. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 147, n. 2, p. 219-225, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2007.09.004>>.

WALSH, G. **Biopharmaceuticals**: biochemistry and biotechnology. London: Wiley, 1998. p. 94.

WEBSTER, R. G.; YAKHNO, M. A.; HINSHAW, V. S.; BEAN, W. J.; MURTI, K. G. Intestinal influenza: replication and characterization of influenza viruses in ducks. **Virology**, Amsterdam, v. 84, n. 2, p. 268-278, 1978. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/0042-6822\(78\)90247-7](http://dx.doi.org/10.1016/0042-6822(78)90247-7)>.

WEBSTER, R. G.; BEAN, W. J.; GORMAN, O. T.; CHAMBER, T. M.; KAWAOKA, Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 56, n. 1, p. 152-179, 1992

WILSON, I. A.; SKEHEL, J. J.; WILEY, D. C. Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3Å resolution. **Nature**, London, v. 289, n. 5796, p. 366-373, 1981.

WU, R.; HU, S.; XIAO, Y.; LI, Z.; SHI, D.; BI, D. Development of indirect enzyme-linked immunosorbent assay with nucleoprotein as antigen for detection and quantification of antibodies against Avian Influenza Virus. **Veterinary Research Communications**, Dordrecht, v. 31, n. 5, p. 631-641, 2007.

YANG, M.; BERHANE, Y.; SALO, T.; LI, M.; HOLE, K.; CLAVIJO, A. Development and application of monoclonal antibodies against avian influenza virus nucleoprotein. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 147, n. 2, p. 265–274, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2007.09.016>>.

YOUNG, C. L.; BRITTON, Z. T.; ROBINSON, A. S. Recombinant protein expression and purification: a comprehensive review of affinity tags and microbial applications. **Biotechnology Journal**, Weinheim, v. 7, n. 5, p. 620–634, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/biot.201100155>>.

ZHOU, E. M.; CHAN, M.; HECKERT, R. A.; RIVA, J.; CANTIN, M. F. Evaluation of a competitive ELISA for detection of antibodies against avian influenza virus nucleoprotein. **Avian Disease**, Kennet Square, v. 42, n. 3, p. 517-522, 1998.

ZUO, X.; MATTERN, M. R.; TAN, R.; LI, S.; HALL, J.; STERNER, D. E.; SHOO, J.; TRAN, H.; LIM, P.; SARAFIANOS, S. G.; KAZI, L.; NAVAS-MARTIN, S.; WEISS, S. R.; BUTT, T. R. Expression and purification of SARS coronavirus proteins using SUMO-fusions. **Protein Expression and Purification**, Amsterdam, v. 42, n. 1, p. 100-110, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pep.2005.02.004>>.