

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

**DETECÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DO VÍRUS DA
BRONQUITE INFECCIOSA PELA TÉCNICA DE
IMUNOCAPTURA-RT-PCR E RFLP**

**Vanessa Mirabelli Toledo Piza
Bióloga**

**JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
2007**

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

**DETECÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DO VÍRUS DA
BRONQUITE INFECCIOSA PELA TÉCNICA DE
IMUNOCAPTURE-RT-PCR E RFLP**

Vanessa Mirabelli Toledo Piza

Orientador: Prof. Dr. Hélio José Montassier

**Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agrária e Veterinárias - UNESP,
Câmpus de Jaboticabal, como parte das
exigências para a obtenção do título de
Mestre em Microbiologia**

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

2007

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

VANESSA MIRABELLI TOLEDO PIZA, nascida em 01 de Agosto de 1982, em Jaboticabal, SP, graduou-se em Ciências – Habilitação Plena em Biologia, no Centro Universitário Barão de Mauá, na cidade de Ribeirão Preto, São Paulo, em Dezembro de 2004. Estagiou no laboratório de Genética de Bactérias (Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária – Unesp/Jaboticabal) de Maio de 2001 a Fevereiro de 2004 e no laboratório de Imunologia e Virologia (Departamento de Patologia Veterinária – Unesp/Jaboticabal) de Junho de 2004 a Fevereiro de 2005. Em Março de 2005 ingressou no curso de pós-graduação em Microbiologia da Universidade Estadual Paulista – Câmpus Jaboticabal.

“Depois de algum tempo você aprende que o sol queima se ficar exposto por muito tempo. E aprende que não importa o quanto você se importe, algumas pessoas simplesmente não se importam. Aprende que as circunstâncias e os ambientes têm influência sobre nós, mas nós somos responsáveis por nós mesmos. Começa a aprender que não se deve comparar com os outros, mas com o melhor que pode ser. Aprende que não importa aonde já chegou, mas onde está indo, e se você não sabe para onde está indo, qualquer lugar serve. Aprende que maturidade tem mais a ver com os tipos de experiência que se teve e o que você aprendeu com elas, do que com quantos aniversários você celebrou. Aprende que há mais dos seus pais em você do que você supunha. Aprende que nem sempre é suficiente ser perdoado por alguém, algumas vezes você tem que aprender a perdoar a si mesmo. Aprende que com a mesma severidade com que julga, você será em algum momento condenado. Aprende que o tempo não é algo que possa voltar para trás. Portanto, plante seu jardim e decore sua alma, ao invés de esperar que alguém lhe trouxesse flores. E você aprende que realmente pode suportar... que realmente é forte, e que pode ir muito mais longe depois de pensar que não se pode mais. E que realmente a vida tem valor e que você tem valor diante da vida!”

(William Shakespeare)

Ofereço e Dedico

Aos meus pais,

Wainer e Maria

Por receberem-me em suas vidas, pela dedicação, compreensão, carinho e amor, eu já seria infinitamente grata. No entanto, vocês abriram as portas do meu futuro, presentearam-me com a riqueza do estudo e fizeram de mim não apenas um profissional, mas um verdadeiro ser humano. Vocês foram essenciais para a minha formação, sem esse apoio eu não teria chegado até aqui. Obrigada pela compreensão quando me distanciei da família apegando-me aos livros, obrigada por tudo que vocês fizeram por mim, sem que ao menos eu soubesse, e, sobretudo, obrigada pela lição de amor que me ensinaram durante toda a vida.

Ao meu irmão,

Rafael

Pelos dias inesquecíveis convividos na nossa infância, pela amizade, companheirismo, carinho e amor; obrigada por estar ao meu lado, me confortar e me ajudar sempre que eu precisei.

A minha avó e tia,

Alice e Wania

Por todas as orações que fizeram, pelo amor, atenção e carinho a mim concedidos, o meu muito obrigada!!!

Ao Danilo,

Seu apoio, atenção, compreensão, confiança, paciência, carinho e amor foram fundamentais para eu superar todas as dificuldades encontradas neste período e conquistar esta etapa. Obrigada por me entender e me ajudar nos momentos em que precisei.

E aos demais amigos e familiares, agradeço por todo apoio e carinho.

Amor, estímulo, carinho e compreensão são a alma desta vitória.

Obrigada por tudo!!!

Agradeço,

A **Deus**, principalmente pela liberdade de pensar, desejar, querer e optar. De não ser nada, mas de poder ter me tornado quem realmente sou. Obrigada Senhor, por todos que entraram em minha vida, em minha história e fizeram-me crescer, enfrentando honestamente as lutas da vida.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Hélio José Montassier pelos ensinamentos, pelo exemplo de conduta e ética, pela paciência, compreensão, dedicação, amizade, apoio nos momentos difíceis, sabedoria na orientação e na elaboração deste trabalho e por todas as oportunidades oferecidas. Por tudo que fez pela minha formação, contribuindo para meu aprimoramento profissional e pessoal, sou-lhe grata.

Aos amigos do Laboratório de Virologia e Imunologia, pelo apoio, convívio, colaboração, paciência e amizade: **Aliandra, Aline, Andressa, Camila, Daniel, Fátima, Igor, Juliana e Mariana.**

A todos os **estagiários** que, de alguma forma me ajudaram.

Em especial,

A **Cíntia** e a **Nicole** por sua generosidade, compreensão e amizade.

A **Maria de Lourdes** (Lurdinha) por seu auxílio, competência e amizade.

As minhas amigas que estiveram ao meu lado em momentos dessa etapa: **Adriana, Andressa, Carina, Milene e Telma.**

A **Ana Paula**, a **Bernadete** e ao seu **Odair**, pelo apoio, convívio, carinho e amor.

A **Biovét** e a **Merial** pela doação de ovos embrionados SPF.

A **CAPES** pela bolsa de Mestrado concedida.

A Coordenação do Programa de **Pós-graduação em Microbiologia da FCAV-UNESP de Jaboticabal**, pelo apoio recebido e condições oferecidas.

A **Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias** – Câmpus de Jaboticabal, através do corpo docente do Programa de Mestrado e Doutorado em Microbiologia, pelas disciplinas ministradas.

A **FAPESP** pelo apoio financeiro a este projeto através do Projeto Temático (01/14950-3R).

A todos os **funcionários e professores** do departamento de Microbiologia, e em especial a **Edna** e a **Rosangela**, agradeço pela atenção que vocês sempre me ofereceram.

Ao **CNPq** pelo apoio financeiro a este projeto (processo número 47.7140/2003-3).

Ao **Grupo Frango Sertanejo**, pela doação dos pintinhos.

SUMÁRIO

Página

LISTA DE ABREVIACÕES.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE TABELAS.....	xiii
RESUMO.....	xiv
SUMMARY.....	xv
I. INTRODUÇÃO.....	1
II. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
III. OBJETIVOS.....	12
IV. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
4.1. Amostras virais.....	13
4.2. Propagação viral em ovos embrionados.....	13
4.3. Avaliação da infectividade viral.....	16
4.4. Infecção experimental.....	16
4.5. Isolamento viral em ovos embrionados SPF.....	17
4.6. Extração de RNA.....	18
4.7. Imunocaptura.....	19
4.8. Oligonucleotídeos.....	19
4.9. Reação de transcrição reversa (RT).....	21
4.10. Reação em cadeia de polimerase (PCR).....	21

4.11. Eletroforese em gel de agarose.....	22
4.12. Análise dos fragmentos amplificados por meio da técnica de “Restriction Fragment Length Polymorphism” (RFLP).....	22
4.13. Determinação da especificidade analítica.....	23
4.14. Determinação da sensibilidade analítica.....	23
 V. RESULTADOS.....	 24
5.1. Determinação da especificidade analítica.....	24
5.2. Determinação da sensibilidade analítica.....	26
5.3. Detecção de diferentes estirpes do VBI através da técnica de IC-RT-PCR e RT-PCR convencional.....	28
5.4. Detecção do VBI em aves infectadas experimentalmente.....	30
5.5 Análise por RFLP das estirpes de referência e isolados de campo.....	35
 VI. DISCUSSÃO.....	 40
 VII. CONCLUSÕES.....	 49
 VIII. REFERÊNCIAS.....	 50

LISTA DE ABREVIACÕES

1. BI: Bronquite Infecciosa
2. BSA: Soro Albumina Bovina
3. cDNA: DNA complementar
4. DEPC: Di-Etil-Piro-Carbonato
5. DIE_{50%}: Dose Infectante Embrionária capaz de infectar 50% dos embriões
6. DNA: Ácido Desoxirribonucléico
7. dNTP: Desoxi-Nucleotídeo-Tri-Fosfato
8. dpi: Dia pós-infecção
9. DTT: Di Thio Treitol
10. EDTA: Etileno Diamino Tetracetato Di-Sódio
11. ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay
12. EUA: Estados Unidos da América
13. g: Gramas
14. h: Horas
15. HI: Inibição de Hemaglutinação
16. IC: Imunocaptura
17. IHC: Imunohistoquímica
18. IV: Isolamento Viral
19. kb: kilo bases
20. LCA: Líquido cório-alantóide
21. M: Membrana
22. min: Minutos
23. mM: Milimolar
24. N: Nucleocapsídeo
25. nm: Nanômetros
26. PBS-Tween: Solução salina tamponada com fosfatos contendo 0,05% Tween
- 20
27. PCR: Reação em Cadeia de Polimerase

- 28. pmol: Picomoles
- 29. RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism
- 30. RNA: Ácido Ribonucléico
- 31. RT: Transcrição Reversa
- 32. S: Superfície
- 33. seg: Segundos
- 34. SPF: Specific Pathogen Free
- 35. TA: temperatura ambiente
- 36. TEB: Tris EDTA Borato
- 37. U: Unidades
- 38. UV: Ultra Violeta
- 39. V: Volts
- 40. VBI: Vírus da Bronquite Infecciosa
- 41. VN: Vírus Neutralização

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Representação esquemática do genoma do VBI e a localização dos oligonucleotídeos utilizados neste estudo.....20
- Figura 2.** Gel de agarose da avaliação da especificidade analítica das reações de IC-RT-PCR e RT-PCR convencional.....25
- Figura 3.** Gel de agarose da avaliação da sensibilidade analítica das reações de IC-RT-PCR e RT-PCR convencional em relação à estirpe M41 do VBI.....27
- Figura 4.** Detecção de diferentes estirpes do VBI testadas pelas técnicas de IC-RT-PCR e RT-PCR convencional.....29
- Figura 5.** Detecção do VBI, através das técnicas de IC-RT-PCR e RT-PCR convencional, em amostras de pulmão de aves infectadas experimentalmente com a estirpe M41 do VBI.....31
- Figura 6.** Detecção do VBI, através das técnicas de IC-RT-PCR e RT-PCR convencional, em amostras de pulmão de aves infectadas experimentalmente com o isolado de campo IBVSC01 do VBI.....32
- Figura 7.** Detecção do VBI, através das técnicas de IC-RT-PCR e RT-PCR convencional, em amostras de pulmão de aves infectadas experimentalmente com o isolado de campo IBVPR03 do VBI.....33
- Figura 8.** Diferenciação das estirpes de referência do VBI, através da reação de RFLP com produtos idênticos de PCR obtidos por técnicas diferentes, IC-RT-PCR e RT-PCR convencional com a enzima *A/I*36

Figura 9. Diferenciação das estirpes de referência do VBI, através da reação de RFLP com produtos idênticos de PCR obtidos por técnicas diferentes, IC-RT-PCR e RT-PCR convencional com a enzima *MbolI*37

Figura 10. Diferenciação dos isolados de campo do VBI, através da reação de RFLP com produtos idênticos de PCR obtidos por técnicas diferentes, IC-RT-PCR e RT-PCR convencional com a enzima *AluI*38

Figura 11. Diferenciação dos isolados de campo do VBI, através da reação de RFLP com produtos idênticos de PCR obtidos por técnicas diferentes, IC-RT-PCR e RT-PCR convencional com a enzima *MbolI*39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estirpes virais de referências e isoladas de campo do VBI utilizadas, classificação quanto ao sorotipo e número de acesso ao GenBank.....15

Tabela 2. Procedência dos oligonucleotídeos utilizados neste estudo.....20

Tabela 3. Frequência de detecção do VBI através dos métodos IC-RT-PCR e RT-PCR convencional em amostras de pulmão de aves infectadas experimentalmente dos grupos A, B e C em relação à frequência do IV.....34

DETECÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DO VÍRUS DA BRONQUITE INFECCIOSA PELA TÉCNICA DE IMUNOCAPTURA-RT-PCR E RFLP

Nesse estudo foi desenvolvido e aplicado o procedimento de imunocaptura para realizar a reação de transcrição reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase (IC-RT-PCR) a fim de ser amplificada uma região 5'- proximal do gene S1 do vírus da bronquite infecciosa (VBI) com 228 pb e de forma a fazer a detecção e a diferenciação desse vírus, comparando-se os resultados dessa metodologia com os obtidos na técnica convencional de RT-PCR. Todas as 11 estirpes do VBI testadas foram amplificadas pelas duas técnicas moleculares, enquanto que nenhum dos vírus heterólogos (Pneumovírus Aviário do grupo A e B, Vírus da Doença de Gumboro e o Vírus da Doença de Newcastle) ensaiados levaram a amplificação específica do gene S1. O limiar de detecção para a técnica de IC-RT-PCR foi idêntico ao do método de RT-PCR e correspondeu a $10^{2.8}$ Doses Infectantes Embrionárias 50%. Para um total de 35 amostras de tecidos do trato respiratório testadas e provenientes de aves infectadas experimentalmente, 32 foram positivas pela técnica de IC-RT-PCR e também pela RT-PCR convencional, enquanto que o isolamento viral foi obtido para 22 dessas amostras. A análise do produto amplificado do gene S1 na IC-RT-PCR através da técnica de RFLP (restriction fragment length polymorphism), com as enzimas *AluI* e *MboII*, permitiu a diferenciação das 5 estirpes de referências e dos 6 isolados de campo analisados em 4 diferentes genótipos, correspondentes às estirpes de referência M41, Connecticut, ou SE-17, ou a um isolado de campo. Portanto, a técnica de IC-RT-PCR demonstrou um grande potencial para ser aplicada no diagnóstico direto do VBI, apresentando vantagens sobre a técnica convencional de RT-PCR, as quais foram derivadas da combinação da especificidade da imunocaptura em fase sólida com a sensibilidade da reação de PCR, o que pode proporcionar ganho de tempo e menor custo para a manipulação de um maior número de amostras.

Palavras-Chave: Vírus da bronquite infecciosa, diagnóstico molecular, imunocaptura, caracterização de variantes.

SUMMARY

Detection and Differentiation of Infectious Bronchitis Virus by Immunocapture RT-PCR and RFLP

In this study, the immunocapture procedure followed by reverse transcription and polymerase chain reaction (IC-RT-PCR) technique was standardized and applied for the amplification of 5'- proximal part of S1 gene of infectious bronchitis virus (IBV) in infected fluid or tissue samples, which were collected from embryonating chicken eggs or experimentally infected birds. The results of this technique were compared with those obtained in conventional RT-PCR. All eleven IBV strains tested were amplified, while none of the heterologous avian viral pathogens (Groups A and B Avian Pneumovirus, Newcastle Disease Virus and Gumboro Disease Virus) gave positive results. The limit of detection for IC-RT-PCR was identical to the common RT-PCR and corresponded to $10^{2.8}$ 50% embryonic infectious doses. Thirty two out of thirty five respiratory tissue samples collected from experimentally infected chickens were positive by both molecular techniques (IC-RT-PCR / common RT-PCR), whereas the virus isolation test detected IBV in twenty two of these samples. The *AluI* and *MobII* RFLP analysis of the 228 bp amplicon generated from IC-RT-PCR led to the discrimination of the 5 reference strains and 6 field IBV isolates in four genotypes; which were associated to the M41, to Connecticut, or to SE-17 strain, or to a field isolate. Therefore, the IC-RT-PCR demonstrated in this study a high potential for the application in the direct diagnosis of IBV and has relevant advantages over the conventional RT-PCR, because it combines the specificity of the immunocapture in a solid phase with the sensitivity of the PCR, providing simplicity, rapidity and low cost for the manipulation of a high number of samples.

Key Words: Infectious bronchitis virus, molecular diagnosis, immunocapture, variant characterization.

I. INTRODUÇÃO

A Bronquite Infecciosa (BI), causada pelo vírus da Bronquite Infecciosa (VBI) é uma enfermidade aguda e altamente contagiosa, que acomete aves da espécie *Gallus gallus*. Este vírus se replica primariamente nas células epiteliais do aparelho respiratório e, após viremia, pode-se propagar e estabelecer sítios secundários de infecção em outros órgãos como os rins e ovidutos e o trato digestório, nos quais juntamente com o aparelho respiratório pode ocasionar lesões de severidade variável, as quais se agravam pela ocorrência de infecções bacterianas secundárias, o que acarreta reduções consideráveis no desempenho produtivo das criações avícolas afetadas por esta virose.

Nos frangos de corte infectados pelo VBI, são principalmente observados um menor ganho de peso, baixa taxa de conversão alimentar e uma maior porcentagem de condenação de carcaças. Já, nas aves de postura, a infecção pelo VBI pode resultar na diminuição da produção de ovos e comprometimento da qualidade interna e de casca dos ovos produzidos, ou ainda pode ser afetada a eclodibilidade de ovos embrionados provenientes de matrizes. São, portanto, relevantes às consequências negativas causadas pelo VBI à produção avícola o que vem caracterizar e ressaltar a importância econômica dessa doença.

Um outro aspecto para melhor dimensionar-se a importância da BI para a sanidade avícola é o fato de que essa enfermidade ocorre em praticamente todas as regiões do mundo, onde existem atividades da avicultura industrial. Apesar de estarem disponíveis vacinas para a realização de esquemas imunoproláticos, o seu controle é extremamente difícil, devido à existência de múltiplos sorotipos e variantes desse agente etiológico, que podem não apresentar um nível suficiente

de epítomos com reatividade cruzada com relação às estirpes usadas na formulação de vacinas.

A propósito da distribuição geográfica da BI, há relatos recentes evidenciando que essa enfermidade tem sido diagnosticada em um número expressivo de criações avícolas industriais localizadas em várias regiões do Brasil, revelando-se uma das enfermidades virais que têm causado maiores perdas econômicas na atualidade para o nosso país. Portanto, a rápida detecção e identificação desse patógeno viral são imprescindíveis para que medidas eficazes de controle sejam mais prontamente tomadas.

Em geral, as infecções pelo VBI podem ser rotineiramente diagnosticadas por meio do isolamento de partículas virais infectantes em sistemas apropriados, como ovos embrionados SPF e culturas de anéis traqueais, ou também da detecção de antígenos virais através de ensaios sorológicos, como os testes de imunofluorescência, de imuno-peroxidase e de ELISA, com anticorpos poli ou monoclonais; ou alternativamente, da revelação de partes do genoma desse vírus com o uso das técnicas de biologia molecular, como a transcrição reversa e da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), seguidas ou não pelos métodos de análise de mapa genômico gerado por enzimas de restrição (RFLP), ou pelo sequenciamento automático de nucleotídeos dos genes mais relevantes desse vírus. Além disso, os métodos sorológicos, como os testes de vírus-neutralização (VN), inibição da hemaglutinação (HI) e ELISA, podem diagnosticar a infecção por este vírus por meio da demonstração da presença de anticorpos anti-VBI específicos, especialmente aqueles pertencentes ao isótipo IgM, ou devido ao fenômeno da soroconversão.

A reação de RT-PCR isoladamente ou em conjunto com outras técnicas da biologia molecular, tais como a análise de fragmentos genômicos gerados por enzimas de restrição; também conhecida como “restriction fragment length polymorphism” (RFLP), a clonagem e o sequenciamento de nucleotídeos do genoma viral, têm sido amplamente utilizadas como meios de diagnóstico para a detecção e caracterização de estirpes do VBI. No entanto, o método de RT-PCR,

quando aplicado para o diagnóstico direto do VBI presente em amostras de tecidos ou de secreções provenientes de aves infectadas, ainda está em progresso e passa por aprimoramentos, sobretudo, no sentido de se buscar uma maior simplificação dos procedimentos e a fim de reduzir o seu tempo de execução e/ou possibilitar a manipulação de um número maior de amostras, sem, contudo, perder a sensibilidade e a especificidade na detecção desse vírus.

Nesse sentido, a técnica de imunocaptura RT-PCR (IC-RT-PCR) pode ser uma alternativa interessante e atraente para contornar algumas dificuldades ainda existentes na técnica de RT-PCR convencional quando é utilizada para o diagnóstico direto do VBI. Esse método é baseado na amplificação de um cDNA sintetizado a partir do RNA de partículas virais previamente capturadas em um suporte sólido, como as paredes das cavidades de uma microplaca de ELISA e foi usada com sucesso para a detecção de RNA-vírus patogênicos para o ser humano, animais e plantas. Ainda, esta técnica torna mais simples a preparação de amostras biológicas, uma vez que menos passos serão necessários para a obtenção do RNA viral molde a ser empregado na RT, tornando-se, então, uma metodologia mais apropriada para ser aplicada na realização de estudos de epidemiologia molecular.

Em vista de todo o exposto, o presente estudo foi desenvolvido, com os objetivos de padronizar e aplicar o método de IC-RT-PCR para a detecção de diferentes estirpes do VBI em líquido cório-alantóide e em amostras biológicas coletadas de ovos embrionados ou de galinhas experimentalmente infectados, avaliando-se comparativamente o desempenho deste método com relação às técnicas de Isolamento Viral (IV) em ovos embrionados de galinha e de RT-PCR convencional; e ainda, de fazer a diferenciação de estirpes e isolados de campo do VBI por meio da análise dos mapas genômicos gerados pela clivagem com enzimas de restrição dos fragmentos gênicos amplificados na IC-RT-PCR.

II. REVISÃO DE LITERATURA

A bronquite infecciosa das aves (BI) é uma doença viral, aguda e altamente infecciosa, que acomete aves de ambos os sexos e das mais diferentes idades, tanto aquelas destinadas à produção de frangos de corte ou à produção de ovos (KING & CAVANAGH, 1991). Essa enfermidade ocorre em praticamente todas as regiões do mundo, onde existem atividades da avicultura industrial, sendo extremamente difícil o seu controle, devido à existência de múltiplos sorotipos e variantes desse agente etiológico, que podem não apresentar um nível suficiente de proteção cruzada com relação às estirpes usadas na formulação de vacinas (COOK, 1984; DI FABIO & ROSSINI, 2000).

O vírus da bronquite infecciosa das aves (VBI) foi isolado e identificado pela primeira vez no estado norte-americano de Dakota do Norte, em 1930. No Brasil, a doença foi diagnosticada inicialmente por HIPÓLITO (1957) e, em 1973, foi descrito o primeiro isolamento de duas amostras nefropatogênicas do VBI (HIPÓLITO et al. 1973).

O VBI é o agente etiológico desta doença, pertence à ordem *Nidovirales*, família *Coronaviridae*, gênero *Coronavírus* (CAVANAGH et al., 1994). A família *Coronaviridae* possui os gêneros *Coronavírus* e *Torovírus*, sendo que o VBI é o protótipo dessa família. O gênero *Coronavírus* foi dividido de início em quatro grupos, com base em propriedades antigênicas e sorológicas, os quais foram posteriormente confirmados pelo sequenciamento de nucleotídeos de importantes genes desses vírus. As proteínas dos vírions possuem menos de 40% de identidade de aminoácidos entre espécies de diferentes grupos. Os grupos 1, 2 e 4 incluem vários vírus que infectam mamíferos, sendo que o grupo 3 é constituído, até o presente momento, pelo coronavírus da bronquite infecciosa, pelo

coronavírus dos perus e pelo coronavírus do faisão (MURPHY et al., 1999; CAVANAGH, 2005).

O vírion apresenta envelope lipo-protéico, o que lhe confere alta sensibilidade às condições ambientais, possui capsídeo com simetria helicoidal e o diâmetro da partícula viral varia de 90 a 200 nanômetros (nm). O genoma desse vírus é composto por uma fita de RNA simples, não segmentada, com sentido positivo e contém 27,6 kilobases (kb) (BOURSNELL et al., 1987). Três diferentes genes são responsáveis por codificar as principais proteínas estruturais deste vírus, isto é, a glicoproteína de superfície (S), a glicoproteína da matriz (M) e a proteína do nucleocapsídeo (N) (STERN & KENNEDY, 1980; CAVANAGH, 1981; SIDDEL et al., 1982; STERN & SEFTON, 1982; STURMAN & HOLMES, 1983; LAI & CAVANAGH, 1997).

A glicoproteína S possui 1160 aminoácidos e é clivada em dois glicopeptídeos, o glicopeptídeo S1 com 520 aminoácidos e o glicopeptídeo S2 com 625 aminoácidos (CAVANAGH & NAQI, 1997). Estes glicopeptídeos estão distribuídos na superfície do envelope. A estrutura tridimensional do glicopolipeptídeo S2 tem o formato de clava e penetra no envoltório lipídico da membrana e desempenha uma função de suporte para S1, o qual possui formato globular (KING & CAVANAGH, 1991; MARTINS, 1992; CAVANAGH & NAQI, 1997).

Foi também demonstrado que o glicopeptídeo S1 é responsável pela infectividade viral e possui determinantes antigênicos que induzem a formação de anticorpos neutralizantes. A variação na composição da sequência de aminoácidos dos mais importantes antígenos é a principal estratégia do VBI para escapar dos mecanismos de defesa do hospedeiro (CAVANAGH et al., 1992; KEELER et al., 1998; COOK et al., 1999). Assim, fica claro que a mutação no gene desta glicoproteína determina o surgimento de novas variantes e até mesmo sorotipos desse mesmo vírus, sendo que a diferenciação das estirpes do VBI fundamenta-se na identificação da região variável da proteína S tanto no que

concerne à caracterização genética como antigênica das diferentes estirpes do VBI (KUSTERS et al., 1987).

Há também evidências de que ocorre recombinação natural entre os genomas de diferentes estirpes do VBI (JIA et al., 1995; KUSTERS et al., 1990; WANG et al., 1993). Dessa forma, como conseqüências de mutações e de recombinações gênicas, aparecem mais variações genéticas e biológicas entre as diversas estirpes do VBI.

Sabe-se ainda que sítios antigênicos induzem anticorpos neutralizantes, cujos epítomos estão situados, na sua maior parte, em S1 (KANT et al., 1992). Tais sítios antigênicos são essenciais no desenvolvimento da proteção específica imune (IGNJATOVIC & GALLI, 1994). Experimentos de vacinação e desafio sugerem que o grau de proteção cruzada entre as estirpes diminui à medida que as diferenças entre as seqüências de S1 aumentam (CAVANAGH & NAQI, 1997).

Esta enfermidade ocorre sob quatro formas clínicas e anatomopatológicas diferentes. Durante as primeiras semanas de vida das aves, ocorrem sinais respiratórios caracterizados por espirros, estertores úmidos da traquéia, morbidade alta e mortalidade elevada. Nos frangos de corte, sob a forma de nefrite-nefrose, com aumento acentuado dos rins, diarreia aquosa, morbidade e mortalidade variáveis (5 a 20%). Nas poedeiras e reprodutoras, ocasionam queda de postura (5 a 30%), produção de ovos defeituosos (casca mole, rugosa, despigmentada), na fase de recria, urolitíase, completa atrofia renal, morbidade e mortalidade variáveis (2 a 10%) (SILVA, 1989; CAVANAGH & NAQI, 1997; DI FÁBIO & ROSSINI, 2000).

As estirpes do VBI, independente do seu tropismo, infectam primariamente células ciliadas da mucosa do aparelho respiratório das aves e produzem lesões características na traquéia, que é o órgão de eleição para sua multiplicação, sendo por isto uma doença primária do aparelho respiratório (KING & CAVANAGH, 1991). No entanto, a patogenia deste vírus é variável, em termos de tropismo tecidual, apresentando não somente tropismo para o trato respiratório, como

tropismo para rins, ovidutos e, ou, aparelho digestório de acordo com o isolado (DHINAKAR & JONES, 1996).

Há também, alguns sorotipos que causam lesões renais mais proeminentes, de vários graus de comprometimento dos tecidos que compõem esse órgão e estão relacionadas à etiologia da nefrite-nefrose aviária (KING & CAVANAGH, 1991); recentemente, foi isolada uma nova estirpe nefropatogênica em Israel (MEIR et al., 2004). Outros aspectos curiosos, dentro do estudo de variantes de patotipos do VBI, foram descritos quando houve o isolamento de uma variante enterotrófica que foi capaz de causar lesões em algumas partes do intestino, bem como o de uma outra variante que causa miopatia peitoral apresentando edema gelatinoso e hemorragia no músculo peitoral das aves (KING & CAVANAGH, 1991; DHINAKAR & JONES, 1996).

A BI vem ocorrendo com grande frequência também em nosso país; em 1973, houve registro do isolamento de duas amostras nefropatogênicas deste vírus (HIPÓLITO et al., 1973). Entre os anos de 1985 e 1986, um levantamento sorológico em frangos, realizado nas regiões do Alto do São Francisco e Metalúrgica de Minas Gerais, revelou soropositividade para o VBI em 38% das 78 granjas avaliadas (JORGE et al., 1992). Além disso, dados contidos em relatórios de dois laboratórios de diagnóstico de Minas Gerais revelaram que a bronquite infecciosa foi à segunda doença viral mais frequente dos casos clínicos submetidos a diagnóstico laboratorial realizados entre 1987 e 1988 (SILVA, 1989). Mais recentemente, ocorreram surtos na Serra Gaúcha, Oeste de Santa Catarina, Sudoeste, Oeste e Norte do Paraná, além do Sul de São Paulo e Triângulo Mineiro (ASSAYAG, 2004).

Assim, por ser o Brasil um dos maiores produtores avícolas do mundo, a bronquite infecciosa configura-se como um grande problema para a avicultura nacional (DI FÁBIO et al., 2000) e o conjunto de informações acima relatado, revela a importância de serem adotados métodos de diagnóstico rápidos e sensíveis para a detecção, diferenciação e identificação do VBI, a fim de poderem ser adotados nos programas de controle desta doença.

Os métodos de diagnóstico convencionais do VBI baseiam-se principalmente no isolamento viral em ovos embrionados SPF (“Specific Pathogen Free”) (GELB, 1989; OWEN et al., 1991) ou culturas celulares (HOPKINS, 1974), seguido de identificação antigênica dos isolados. Três ou mais passagens em ovos embrionados são geralmente necessárias para o isolamento primário do VBI, o que torna tais procedimentos onerosos e demorados.

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

Além disso, o VBI também pode ser detectado diretamente em tecidos de aves infectadas por meio de técnicas de imunohistoquímica (IHC) com anticorpo poli ou monoclonal ou por hibridização “in situ” com o auxílio de sondas de oligonucleotídeos (COLISSON et al., 1990).

Os métodos sorológicos mais utilizados no diagnóstico da BI são a inibição de hemaglutinação (HI), vírus-neutralização (VN) (CAPUA et al., 1999) e o ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay), realizado com anticorpos monoclonais ou policlonais (IGNJATOVIC & ASHTON, 1996; WANG et al., 2002). No entanto, em alguns casos são observados problemas relacionados ao desenvolvimento de reações inespecíficas, baixa sensibilidade, subjetividade da análise dos resultados, além da impossibilidade, no caso das reações imunoenzimáticas, de discriminação entre as diferentes estirpes do VBI.

Com o advento da reação de PCR (SAIKI et al., 1985; MULLIS et al., 1986; MULLIS & FALOONA, 1987) foram trazidos importantes fundamentos para a montagem de métodos eficientes e mais rápidos de diagnóstico laboratorial de agentes infecciosos, redundando em uma melhoria significativa da sensibilidade e especificidade do diagnóstico etiológico de várias doenças infecciosas ou parasitárias.

A PCR é uma técnica capaz de produzir grandes quantidades de fragmentos de DNA amplificado a partir de uma pequena quantidade de amostra inicial. O processo utiliza uma DNA-polimerase termoestável (Taq polimerase) e iniciadores específicos que se ligam à região do genoma a ser amplificada. A reação é baseada em três etapas básicas: (1) desnaturação do DNA da amostra, (2) anelamento dos oligonucleotídeos a essa mesma molécula de ácido nucléico e (3) extensão ou polimerização das novas moléculas do DNA a serem amplificadas a partir de cada oligonucleotídeo utilizado (KWOH & KWOH, 1990; JACKWOOD et al., 1992).

Em adição à técnica de PCR, a reação em cadeia da polimerase, antecedida pela transcrição reversa (RT-PCR), tem sido amplamente utilizada como um meio de diagnóstico rápido, sensível e específico nas infecções com o VBI (JACKWOOD et al., 1992; CAVANAGH, 1993).

LIN et al. (1991) foram os primeiros a utilizarem a reação de RT-PCR no diagnóstico do VBI, amplificando parte da região S2 de seis isolados virais dos EUA e nove isolados do Japão. Em 1992, ZWAAGSTRA et al. (1992) amplificaram parte do gene N, a partir de amostras de LCA infectadas com 5 isolados do sorotipo Massachusetts e 13 isolados da Holanda do VBI, realizando o sequenciamento a fim de identificar a estirpe viral. JACKWOOD et al. (1992) e ADZAR et al. (1996) também utilizaram esta técnica em seus estudos para detecção do VBI em LCA, comprovando mais uma vez sua eficiência.

Diante disso, esta metodologia pode ser empregada isoladamente ou em conjunto com as técnicas de clonagem e sequenciamento de nucleotídeos de genes mais relevantes do VBI (ADZAR et al., 1997; LEE & JACKWOOD, 2000; SMATI et al., 2002; ABDEL-MONEIM et al., 2006; MONTASSIER et al., 2006a) e, no caso específico de ser usada para a amplificação do gene codificador da glicoproteína S1, pode ser empregada na análise de fragmentos genômicos gerados por enzimas de restrição; na técnica denominada RFLP (KWON et al., 1993b) e de sequenciamento direto de nucleotídeos de regiões mais variáveis ou até mesmo de todo este gene.

A propósito, a técnica de RT-PCR associada com a análise de fragmentos genômicos gerados por enzimas de restrição, método denominado RFLP (restriction fragment length polymorphism analysis) permite a detecção e identificação de diferentes estirpes de VBI isoladas de surtos a campo de infecção por este vírus. Devido a **isso**, KWON et al. (1993a, 1993b), WANG & TSAI (1996) e PIZA et al. (2005) obtiveram bons resultados na identificação de diferentes genótipos do VBI ao analisarem os produtos obtidos na amplificação do gene S1 pela PCR, por meio da realização da técnica de RFLP.

No entanto, o desenvolvimento do método de RT-PCR, aplicado no diagnóstico direto do VBI presente em amostras de tecidos ou de secreções provenientes de aves, é uma metodologia que ainda está em progresso e vem passando por processos de aprimoramentos (KWON et al., 1993a; CAVANAGH & NAQI, 1997). E, ainda, deve ser considerado que são necessários procedimentos cautelosos no desenvolvimento desta reação devido ao alto risco de contaminação na manipulação das amostras a serem testadas.

Nesse sentido, foi desenvolvida a técnica de Imunocaptura-RT-PCR (IC-RT-PCR), para detecção do RNA viral. Este processo é baseado na amplificação do cDNA sintetizado a partir de um RNA genômico viral contido em partículas virais capturadas por um anticorpo anti-viral específico. Este método foi utilizado primeiramente por JANSEN et al. (1990) para detecção do Vírus da Hepatite A em espécimens fecais obtidos de macacos e pacientes com Hepatite A da Carolina do Norte, Kansas; obtiveram bons resultados e consideraram que a técnica possui elevado potencial para diagnóstico laboratorial devido à redução do número de passos quando comparada com a PCR.

Em 1992, a técnica de imunocaptura foi utilizada para detecção de um vírus que causa infecção em ameixeiras, tendo demonstrado alta sensibilidade e mostrado claramente a sua superioridade para a detecção de baixas concentrações deste vírus presentes em amostra teciduais de árvores infectadas, quando comparada com o diagnóstico realizado pelo teste ELISA (WETZEL et al., 1992).

NOLASCO et al. (1993) fizeram algumas modificações na reação de imunocaptura e passaram a utilizar as cavidades de uma microplaca de poliestireno; semelhante a uma microplaca de ELISA, ao invés de tubos de polipropileno, que eram inicialmente usados, para a detecção de patógenos virais de plantas e, também obtiveram resultados superiores na detecção desse fito-patógeno, quando são levados em comparação os resultados da técnica de ELISA empregada para esta mesma finalidade.

Em 2001, esta técnica foi, também, empregada para a detecção do vírus que causa a doença hemorrágica nos coelhos, tendo sido comprovada a eficiência e rapidez deste método, sobretudo, quando é testado um grande número de amostras. Dessa forma, estes autores conseguiram testar 20 isolados deste vírus, em apenas um dia, utilizando uma única microplaca, enquanto no outro método utilizado, foi possível testar apenas de 4 a 6 isolados em 2,5 dias (GALL-RECUÉ et al., 2001).

Esta metodologia vem sendo empregada com sucesso para outras famílias de RNA vírus (MUNFORD & SEAL, 1997; JACOBI et al., 1998; HEMA et al., 2003; YU et al., 2005; MONTASSIER et al., 2006b), mostrando que esta técnica possui uma alta sensibilidade, especificidade, maior rapidez quando comparada a outras técnicas imunológicas e moleculares; e pode ser utilizada para estudos epidemiológicos ou clínicos (JANSEN et al., 1990; NOLASCO et al., 1993; GALL-RECUÉ et al., 2001; YU et al., 2005).

Considerando os fatos apresentados e tendo em vista que a IC-RT-PCR é uma técnica que pode apresentar vantagens significativas para o diagnóstico do VBI, foi realizado o presente estudo com o objetivo de desenvolver o método de IC-RT-PCR para a detecção de estirpes do VBI presentes em líquido cório-alantóide e amostras biológicas coletadas de galinhas infectadas experimentalmente, comparando-se este primeiro método com o desempenho das técnicas de RT-PCR convencional e da técnica padrão de isolamento viral em ovos embrionados de galinhas e, de posse dos produtos amplificados da região 5'-

proximal do gene S1, aplicar a técnica de RFLP para fazer a diferenciação de estirpes do VBI em amostras provenientes de líquido cório-alantóide.

III. OBJETIVOS

- Desenvolver e aplicar os métodos de IC-RT-PCR e RT-PCR convencional para a detecção do VBI em líquido cório-alantóide e amostras teciduais coletadas de ovos embrionados ou de galinhas infectados experimentalmente.
- Determinar a sensibilidade e especificidade analítica de cada uma das técnicas de biologia molecular desenvolvida neste estudo.
- Comparar os resultados obtidos em cada um dos métodos de diagnóstico molecular empregados neste estudo, com os resultados obtidos na técnica padrão de isolamento viral em ovos embrionados de galinhas.
- Avaliar a capacidade da técnica de RFLP em diferenciar estirpes de referência e isolados de campo do VBI, a partir do fragmento gênico amplificado nas técnicas de IC-RT-PCR e de RT-PCR convencional.

IV. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Amostras Virais

Foram utilizadas cinco estirpes de referência (M41, Connecticut, Iowa 97, Iowa 609 e SE-17) e seis isolados de campo (IBVSC01, IBVPR08, IBVPR03, IBVPR07, IBVSP02, IBVSP03) do VBI. Os vírus foram propagados na cavidade cório-alantóide de ovos embrionados SPF (“Specific Pathogen Free”) com nove dias de incubação. As estirpes IBVSC01, IBVPR08, IBVPR03, IBVPR07 foram cedidas pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA (Concórdia-SC) e as estirpes IBVSP02 e IBVSP03 foram cedidas pelo laboratório SPAVE – São Paulo.

Além dessas estirpes, foram incluídos quatro vírus aviários não relacionados ao VBI, os quais foram utilizados na avaliação da especificidade analítica das técnicas de IC-RT-PCR e RT-PCR convencional. Estes vírus, obtidos de vacinas “vivas” atenuadas e liofilizadas, foram o Pneumovírus Aviário (AVP, Biovet, Brasil, grupo A e o AVP, Merial, EUA, grupo B), o vírus da doença de Newcastle (NDV, Merial, Brasil, estirpe LaSota) e o vírus da doença de Gumboro (GDV, Merial, Brasil, estirpe Lukert).

4.2. Propagação viral das estirpes do VBI em ovos embrionados SPF

Esta técnica foi realizada com base na descrição de OWEN et al. (1991), com a introdução de algumas alterações. Cada estirpe viral foi inoculada na cavidade cório-alantóide de ovos embrionados SPF com 9 a 11 dias de incubação, sendo assim submetidas a três passagens sucessivas.

Em cada passagem, foram utilizados 25 ovos por amostra, sendo 22 destinados à infecção viral e três ao controle (ovos inoculados somente com meio Eagle) da infecção pelo VBI. A inoculação foi feita na cavidade alantóide, administrando-se um volume de 200 μ l/ovo. Após 24 horas (h) de incubação, os ovos foram avaliados, sendo a mortalidade ocorrida neste período considerada inespecífica. Decorridas 36 h, os ovos foram retirados da incubadora e resfriados a 4°C, e o líquido cório-alantóide (LCA) foi colhido, alicotado em microtubos de 1,5 ml e estocado a -70°C até ser processado nos métodos de titulação da infectividade viral e posteriormente nos métodos de IC-RT-PCR e RT-PCR.

A mortalidade embrionária dos três ovos (controle) foi avaliada diariamente, sendo os embriões mortos classificados como positivos ou negativos, respectivamente, de acordo com a presença ou a ausência de lesões características do VBI no embrião de galinha (nanismo, enrolamento e/ou hemorragia), mediante a comparação com os embriões do grupo controle negativo (3 ovos SPF que não foram inoculados com vírus). Ao final do sétimo dia pós-inoculação, todos os ovos foram abertos e os embriões submetidos à mesma pesquisa de lesões características descritas anteriormente.

Tabela 1. Estirpes virais de referência e isoladas de campo do VBI utilizadas, classificação quanto ao sorotipo e número de acessos no GenBank.

	Estirpe	Sorotipo	Número de acesso^a
Estirpes de Referência	Connecticut	Connecticut	L18990
	Iowa 97	Iowa	não seqüenciada
	Iowa 609	Iowa	não seqüenciada
	M41	Massachussets	M21970
	SE 17	SE 17	AF239984
Estirpes isoladas de campo	IBVSC01	-	-
	IBVPR03	-	-
	IBVPR08	-	-
	IBVPR07	-	-
	IBVSP02	-	-
	IBVSP03	-	-

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

4.3. Avaliação da infectividade viral das estirpes do VBI

A infectividade viral foi determinada para as estirpes M41, IBVSC01 e IBVPR03 do VBI através da titulação viral em ovos embrionados SPF, com 9 a 11 dias de incubação. Partindo-se do LCA colhido de ovos infectados após a terceira passagem, foi determinado o número de Doses Infectantes Embrionárias 50% (DIE_{50%}). Para tanto, diluições de razão constante igual a 10 (10^{-3} a 10^{-9}) das estirpes de VBI presentes em LCA foram preparadas em Meio Eagle (Gibco BRL, EUA) contendo antibióticos (200 UI/mL de penicilina e 50 µg/mL de estreptomicina) e antifúngico (50 UI/mL de micostatina) e inoculados na cavidade alantóide, no volume de 200 µL/ovo. Foram utilizados cinco ovos para cada diluição, além de dez ovos destinados ao controle (não infectados). A mortalidade foi observada durante todo o período de incubação, considerando-se morte inespecífica com 24 h pós-incubação e, ao final de sete dias, as alterações embrionárias dos sobreviventes foram analisadas. A DIE_{50%} foi determinada de acordo com o procedimento descrito por REED & MUENCH (1938).

4.4. Infecção experimental

Foram utilizadas 38 aves de corte, fornecidas com 1 dia de idade, pelo incubatório do Grupo Frango Sertanejo, Ipiranga – SP, as quais foram mantidas em isoladores com pressão positiva e com fornecimento de ar purificado por filtração absoluta.

Aos 28 dias de idade, 3 aves foram sacrificadas constituindo o grupo de controle negativo, sendo as demais aves do grupo A (14 aves), grupo B (11aves) e do grupo C (10 aves) aos 42 dias de idade inoculadas com suspensões infectantes das estirpes M41, IBVSC01 e IBVPR03 do VBI, respectivamente, contendo 10^5 DIE₅₀ /ave, através da inoculação de duas gotas via ocular e duas gotas via intranasal.

As aves dos 3 grupos foram sacrificadas na fase aguda de infecção, isto é, do 5 ao 10 dia após a infecção experimental (dpi), tendo sido coletadas as amostras de pulmão, que foram armazenadas em Caldo Triptose Fosfato (Difco) acrescido de antibióticos (200 UI/mL de penicilina e 50 µg/mL de estreptomicina) e antifúngico (50 UI/mL de micostatina), sendo então armazenados a -20°C até o momento de serem processadas nas técnicas de isolamento viral e extração de RNA genômico para ser aplicado nos métodos de IC-RT-PCR e RT-PCR convencional.

4.5. Isolamento viral em ovos embrionados SPF

O isolamento viral foi realizado consoante com a técnica recomendada por OWEN et al., (1991), com a introdução de algumas modificações. As amostras de pulmões foram descongeladas e maceradas. Cada amostra foi homogeneizada em suspensão a 20 % (p/v) de Meio Eagle (Gibco BRL, EUA) acrescido de 10 % de Caldo Triptose Fosfato (TPB – Difco), de antibióticos (Penicilina a 200 UI/mL e Estreptomicina a 50 µg/mL) e antifúngico (Fungizone a 50 UI/mL). A suspensão tecidual foi então clarificada por centrifugação a 2000 xg por 5 minutos (min), a 4°C, sendo o sobrenadante coletado e armazenado a -70°C até o momento da inoculação em ovos embrionados SPF com 9 a 11 dias de incubação, tendo sido utilizados cinco ovos para cada amostra. A inoculação foi feita na cavidade alantóide, administrando-se um volume de 100 µL/ovo e decorrido 24 h de inoculação, os ovos foram avaliados, sendo que a mortalidade ocorrida nesse período foi considerada inespecífica. No intervalo de 36 h pós-inoculação, dois ovos por amostra foram retirados da incubadora e colocados sob refrigeração a 4°C e o líquido cório-alantóide (LCA) foi colhido e estocado a -70°C para ser utilizado em uma segunda passagem em ovos embrionados. A mortalidade dos demais ovos foi avaliada diariamente até completar 7 dias da inoculação, sendo que os embriões mortos foram classificados como positivos ou negativos, conforme a presença ou a ausência de lesões características do VBI no embrião.

da galinha (nanismo, enrolamento e/ou hemorragia), mediante a comparação com os embriões do grupo controle (10 ovos não infectados). Ao final do sétimo dia pós-inoculação, todos os ovos foram abertos e os embriões foram submetidos à mesma pesquisa de lesões características relatadas anteriormente. Foram realizadas mais duas passagens nas mesmas condições descritas acima.

4.6. Extração do RNA

A extração do RNA foi realizada com o auxílio do kit comercial Trizol LS Reagent (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA) nas amostras de LCA e Trizol Reagent (Invitrogen Corp.) para as amostras de tecidos, seguindo-se as recomendações do fabricante, com a introdução de algumas modificações, abaixo explanadas.

As amostras teciduais de pulmões provenientes das aves infectadas experimentalmente (0,1 - 0,2 g) foram maceradas juntamente com 1000 µL de Trizol Reagent, utilizando o auxílio de um micropistilo de plástico (Eppendorf) em um microtubo. Para as amostras de LCA, a proporção 1:1 (Trizol LS Reagent : LCA) foi estabelecida, ou seja, cerca de 500 µL de Trizol LS Reagent foram adicionados a 500 µL de LCA. Em seguida, homogeneizou-se a mistura por 15 segundos (seg) no vórtex e incubou-se por 5 min à temperatura ambiente (TA). Logo após foi adicionado 200 µL da mistura de clorofórmio e álcool isoamílico (na proporção de 24:1), realizando agitação por inversão. Após um período de 3 min à TA, as amostras foram centrifugadas a 12000 xg durante 15 min a 4°C. A fase aquosa, em volume de aproximadamente 500 µL foi transferida para outro microtubo (1,5 mL), onde se adicionou um volume de álcool isopropílico de 500 µL, agitando-se, delicadamente, por inversão 10 vezes. A seguir, incubou-se por 10 min no freezer -70 °C, centrifugando-se em seguida, a 12000 xg, por 10 min a 4°C. O álcool isopropílico foi descartado e adicionou-se 1000 µL de etanol (75 %), em seguida as amostras foram homogeneizadas e centrifugadas a 7.500 xg por 5 min à temperatura de 4°C, descartando-se, ao final, o sobrenadante. Para finalizar,

as amostras foram colocadas para secar a TA por 20 min, e em seguida os precipitados foram ressuspensos em 15 μ L de água tratada com Dietilpirocarbonato 0,1% (DEPC) para utilização na reação de transcrição reversa (RT).

4.7. Imunocaptura

A reação de imunocaptura para a realização da técnica de IC-RT-PCR foi realizada de acordo com o método preconizado por JANSEN et al., (1990), com a introdução de algumas modificações. Em resumo, foram adicionados, às microplacas de poliestireno (Costar), 200 μ L da solução de anticorpo de captura (antissoro de galinhas hiperimunizadas com a estirpe M41 do VBI) em sua diluição ideal de uso (1:500), preparada em tampão carbonato-bicarbonato 0,05 M, pH 9,6, deixando-se a reação de adsorção ocorrer por 2 h a 37°C em câmara úmida. Ao final dessa etapa, as cavidades da microplaca foram submetidas a cinco lavagens com solução salina tamponada com fosfatos pH 7,4, contendo 0,05% Tween 20 (PBS-Tween) e, a seguir, foi feito o bloqueio da superfície das cavidades da microplaca por meio da adição de 275 μ L de solução de soro albumina bovina a 1% (BSA) diluída em PBS-Tween, incubando-se esta fase por uma hora a 37°C em câmara úmida. As cavidades da microplaca foram novamente lavadas cinco vezes com PBS-Tween e, em seguida, foram adicionadas as amostras de suspensões virais (referência, isoladas de campo, provenientes de aves infectadas experimentalmente), em um volume de 200 μ L/cavidade, incubando-se *overnight* a 4°C em câmara úmida as amostras provenientes de tecido e a 2 h a 37°C em câmara úmida as amostras provenientes de LCA. Após esta etapa de incubação, foram feitas seis lavagens das cavidades da microplaca com PBS-Tween, sendo, na etapa subsequente adicionada a cada cavidade da microplaca um volume de 22,5 μ L da mistura de reagentes da reação de RT.

4.8. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados

Foi utilizado um par de oligonucleotídeos iniciadores, localizados na subunidade S1 do gene S do VBI, suas seqüência de nucleotídeos e sua localização sobre o gene S, encontram-se na **Tabela 2**. A representação esquemática do genoma do VBI com a localização desses oligonucleotídeos encontram-se na **Figura 1**.

Tabela 2. Seqüência e localização dos oligonucleotídeos utilizados neste estudo.

Nome	Seqüência de oligonucleotídeos (5' – 3')	Localização ^a	Referência
C2U (+)	TGGTTGGCATTACACGGGG	196-215/S1- M21883	WANG & TSAI (1996)
C3L (-)	CAA TGT GTA ACA AAC AC	407-423/S1 M21883	WANG & TSAI (1996)

+ : *forward*

- : *reverse*

^a : Localização da seqüência de nucleotídeos do gene S representada pelo número de acesso no GenBank.

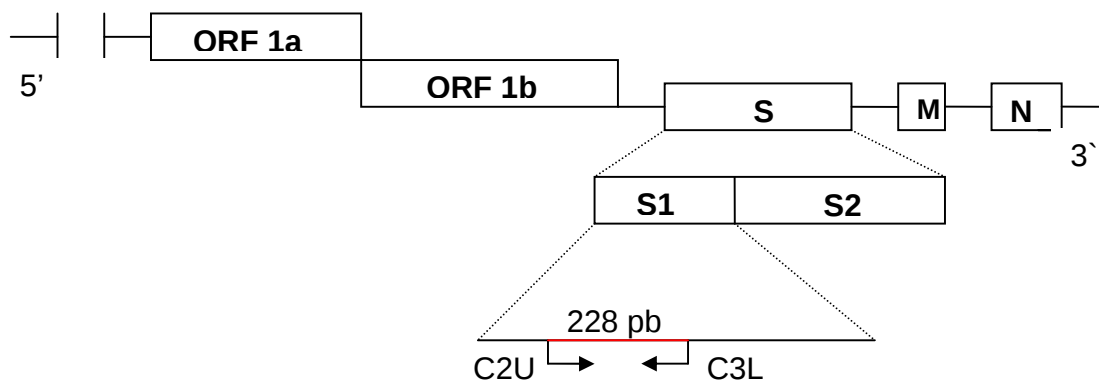


Figura 1. Representação esquemática do genoma do VBI e a localização dos oligonucleotídeos utilizados neste estudo.

4.9. Reação de transcrição reversa (RT)

A reação de transcrição reversa foi realizada em um Termociclador PTC – 200 Peltier Thermal Cycler (MJ Research, Bio Rad, USA) incubando-se a 25°C durante 10 min: 5 µL do RNA extraído, 0,5 mM de dNTP (Invitrogen, Carlsbad, CA), 0,25 µg de Random Primer (Invitrogen, Carlsbad, CA), 33 Unidades(U) de RNAGuard (GE-Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido) e 7,5 µL de água-DEPC. Em seguida, acrescentou-se o Tampão da enzima 5 x (Invitrogen, Carlsbad, CA), 10 mM de DTT (Invitrogen, Carlsbad, CA) e incubou-se a 42°C durante 2 min, adicionando-se 200 U da enzima SuperScript II (Invitrogen, Carlsbad, CA) e incubando-se a reação a 42°C durante 60 min e no final a 70°C por 15 min. O volume final da reação foi de 20 µL, o qual foi armazenado a -20°C para ser utilizado na técnica de PCR.

Após o termino da reação de RT as amostras da reação de IC-RT-PCR foram recolhidas da placa e colocadas em tubos de polipropileno.

4.10. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para a reação em cadeia da polimerase (PCR) foram utilizados 5 μ L do cDNA obtido na reação de RT, 0,5 mM de dNTP, tampão de PCR 10 x (Invitrogen, Carlsbad, CA), 10 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador, 1,5 mM de cloreto de magnésio, 1,0 U de enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen, Carlsbad, CA), completando com água-DEPC para um volume de 25 μ L, sendo a reação realizada em um Termociclador PTC – 200 Peltier Thermal Cycler (MJ Research, Bio Rad, U.S.A).

O perfil térmico de incubação da PCR ficou constituído por um ciclo inicial a 95°C por 8 min, seguindo-se mais 40 ciclos constituídos por: desnaturação de 95°C por 1 min, anelamento de 45°C por 1 min e extensão de 72°C por 1 min e ainda de mais um ciclo de extensão final a 72°C por 10 min.

4.11. Eletroforese em gel de agarose

Para a análise dos resultados das reações de IC-RT-PCR e RT-PCR convencional, foram adicionados 2 μ L de tampão amostra [0,05% (p/v) de azul de bromofenol, 40% de sacarose (p/v), Tris-HCl 10mM, pH 7,8, EDTA 1 M, pH 8,0] em 5 μ L de produto amplificado, o qual foi analisado através da técnica de eletroforese em sistema horizontal, em tensão de 70 V por aproximadamente uma hora e meia, em gel de agarose 1,5% imerso em tampão TEB 0,5X (Tris 0,045 M, Ácido Bórico 0,045 M e EDTA 0,001 M, pH 8,0), adicionado de brometo de etídio (0,5 μ g/ μ L). A migração desses fragmentos de DNA foi comparada com a de um padrão de peso molecular 100 bp DNA “ladder” (Invitrogen, Carlsbad, CA). Os fragmentos de DNA amplificados foram visualizados através de incidência de luz

ultravioleta através de um transiluminador (Syngene, Cambridge, Reino Unido), e os géis foram, a seguir, fotodocumentados através da utilização de uma câmera digital (Synoptics) e do software Gene Link (Syngene, Reino Unido).

4.12. Análise dos fragmentos amplificados por meio da técnica de “Restriction Fragment Length Polymorfism” (RFLP)

Foram realizadas digestões enzimáticas dos produtos amplificados do gene S1 proveniente das reações de IC-RT-PCR e RT-PCR convencional, seguindo-se os protocolos recomendados por WANG & TSAI (1996) e pelos fornecedores de cada enzima, *AluI* (New England Biolabs, Beverly, MA) e *MboII* (GE-Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido).

Estas mesmas enzimas de digestão foram utilizadas por WANG & TSAI (1996), para agrupar diferentes sorotipos do VBI.

Em resumo, para a enzima *AluI* foram adicionados 1 µL de tampão, 1 µL da enzima, 7,2 µL de água-DEPC e 0,8 µL da amostra de PCR. Para a clivagem com a enzima *MboII* foram adicionados 1 µL de tampão, 0,5 µL da enzima, 6,5 µL de água-DEPC e 2 µL da amostra de PCR. A mistura foi colocada em bloco a 37°C durante 16 h.

Ao final dos procedimentos de digestão, os produtos dessas reações foram adicionados de um volume de 2 µL de tampão de diluição da amostra e, em seguida, aplicou-se todo o material na canaleta do gel de agarose a 3,0% para que fosse realizada a corrida de eletroforese. A corrida eletroforética foi, por sua vez, feita em um tampão de corrida TEB 0,5X (Tris 0,045 M, Ácido Bórico 0,045 M e EDTA 0,001 M, pH 8,0), por cerca de três h a 70V e, ao final desse período, fez-se a visualização dos fragmentos de DNA gerados pela clivagem com as enzimas de restrição, em um transiluminador UV e os géis foram, a seguir, fotodocumentados através da utilização de uma câmera digital (Synoptics) e do software Gene Link (Syngene). A leitura e interpretação dos resultados observados foi feita de forma comparativa com um padrão de fragmentos de DNA

de tamanhos conhecidos (10 bp DNA “ladder” – Invitrogen, Carlsbad, CA), sendo, também, o gel previamente corado com 5 µL de brometo de etídio.

4.13. Determinação da especificidade analítica

A especificidade analítica foi avaliada testando-se quatro outros RNA-vírus aviários, que foram obtidos a partir de amostras virais provenientes de vacinas “vivas” atenuadas como o Pneumovírus Aviário (AVP, Biovet, Brasil, grupo A e o AVP, Merial, EUA, grupo B), o vírus da doença de Newcastle (NDV, Merial, Brasil, estirpe LaSota) e o vírus da doença de Gumboro (GDV, Merial, Brasil, estirpe Lukert) na reação de IC-RT-PCR e RT-PCR convencional.

4.14. Determinação da sensibilidade analítica

A sensibilidade analítica das reações foi avaliada a partir do LCA da estirpe M41. Para tanto, o LCA foi submetido a diluições seriadas de razões constante igual a razão 10 (10^0 a 10^{-6}), com um título infectante correspondente a 10^5 DIE₅₀/mL.

V. RESULTADOS

5.1. Determinação da especificidade analítica

A especificidade dos oligonucleotídeos (C2U/C3L) utilizados neste estudo foi comprovada nas técnicas de IC-RT-PCR e RT-PCR convencional, as quais demonstraram a amplificação de fragmento genômico específico do VBI somente nas amostras provenientes do LCA da estirpe M41; não havendo amplificação de produto genômico para os quatro vírus aviários heterólogos não relacionados ao VBI (Grupos A e B do Pneumovírus aviário, a estirpe LaSota do vírus da doença de Newcastle e a estirpe Lukert do vírus da doença de Gumboro). Os resultados da especificidade analítica dessas reações encontram-se na **Figura 2**.

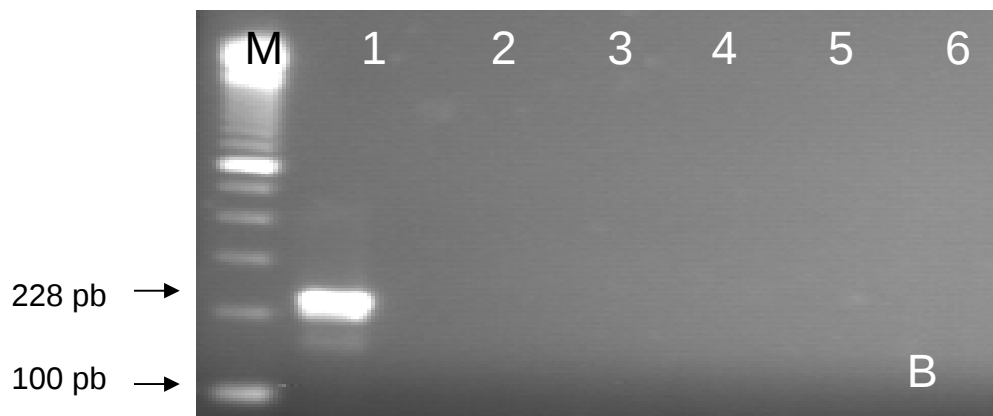
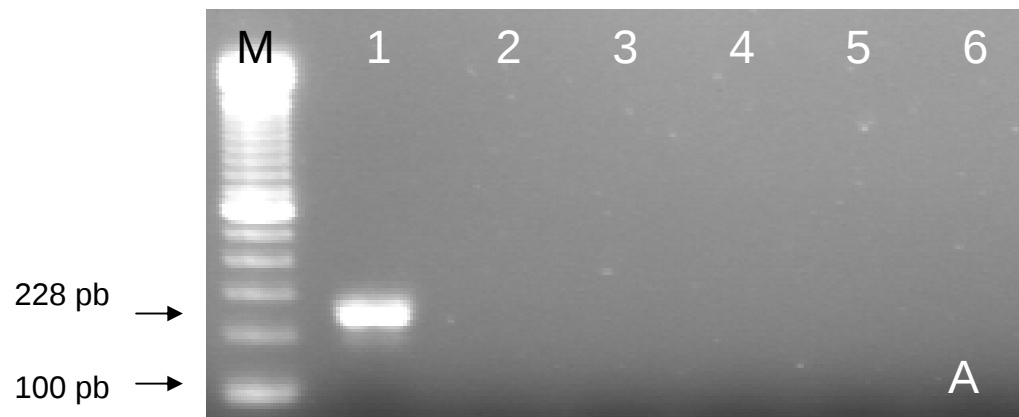


Figura 2. Avaliação da especificidade analítica das reações de IC-RT-PCR (A) e RT-PCR convencional (B). Legenda: (M) Marcador 100bp (Invitrogen), (1) estirpe M41 do VBI, (2) pneumovírus aviário do grupo A, (3) pneumovírus aviário do grupo B, (4) vírus da doença de Gumboro, (5) vírus da doença de Newcastle, (6) Controle negativo.

5.2. Avaliação da sensibilidade analítica

A sensibilidade analítica revelou o mesmo limite de detecção para ambas as técnicas de diagnóstico molecular empregadas no presente estudo (IC-RT-PCR e RT-PCR convencional), havendo detecção de produto amplificado até a diluição de 10^{-5} do LCA infectado com a estirpe M41, o qual se apresentou após a separação eletroforética no gel de agarose corado com brometo de etídio, sob a forma de bandas com tamanho específico de 228 pb (**Figura 3**).

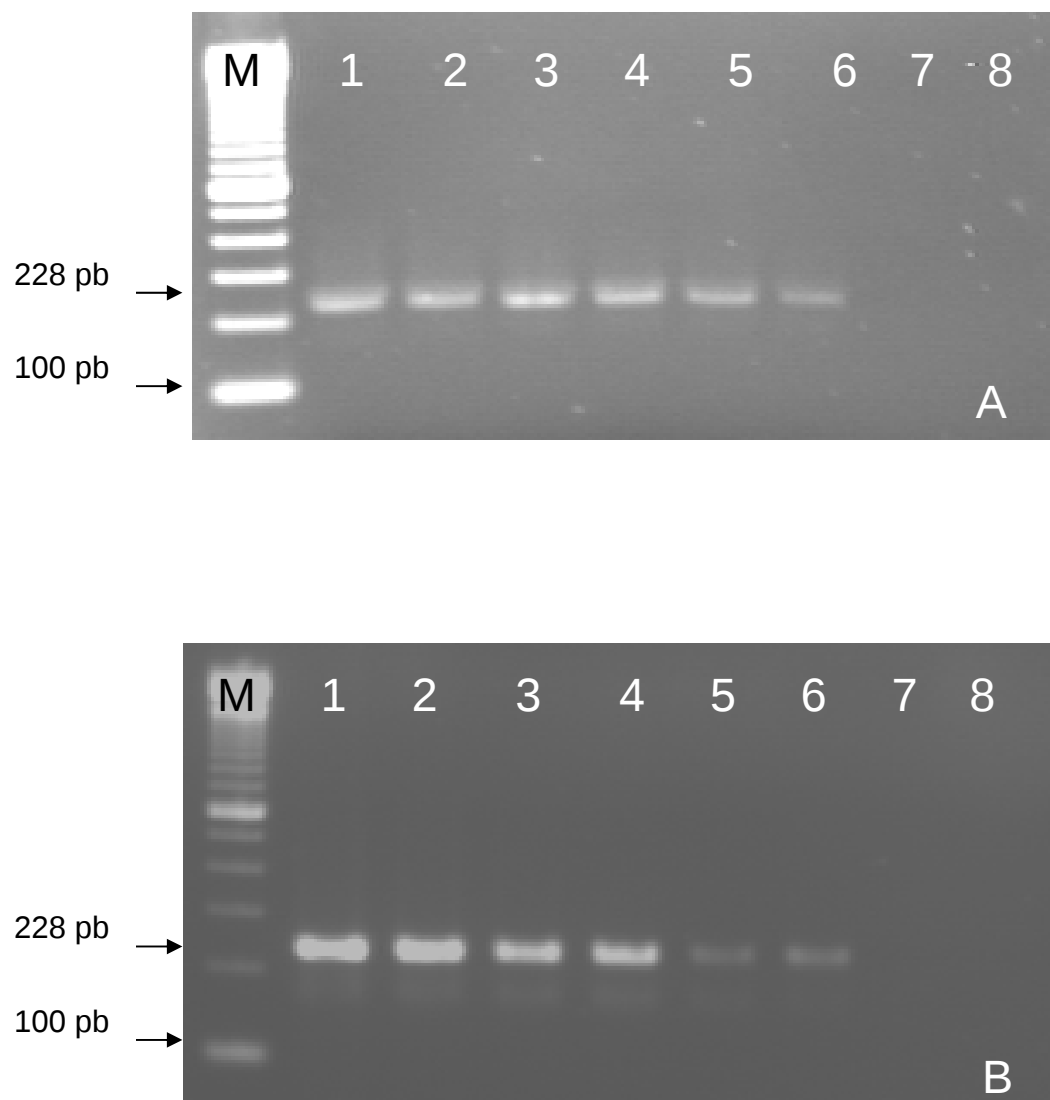


Figura 3. Avaliação da sensibilidade analítica das reações de IC-RT-PCR (A) e RT-PCR convencional (B) em relação a diluições seriadas da estirpe M41 do VBI. Legenda: (M) Marcador 100bp (Invitrogen), (1) M41 (10^0), (2) diluição 10^{-1} , (3) 10^{-2} , (4) 10^{-3} , (5) 10^{-4} , (6) 10^{-5} , (7) 10^{-6} , (8) Controle Negativo.

5.3. Detecção de diferentes estirpes do VBI através da técnica de IC-RT-PCR e RT-PCR convencional.

As 11 estirpes do VBI testadas (Connecticut, Iowa 97, Iowa 609, M41, SE-17, IBVSC01, IBVPR08, IBVPR03, IBVPR07, IBVSP02 e IBVSP03) foram amplificadas com a utilização de um par de oligonucleotídeo (C2U/C3L), gerando produtos amplificados de 228 pb para as técnicas de IC-RT-PCR e RT-PCR convencional (**Figura 4**).

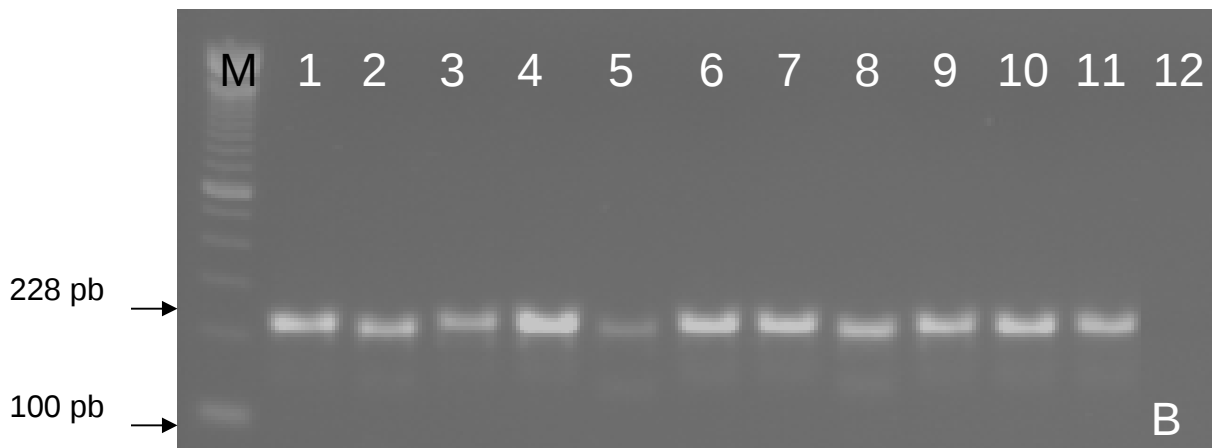
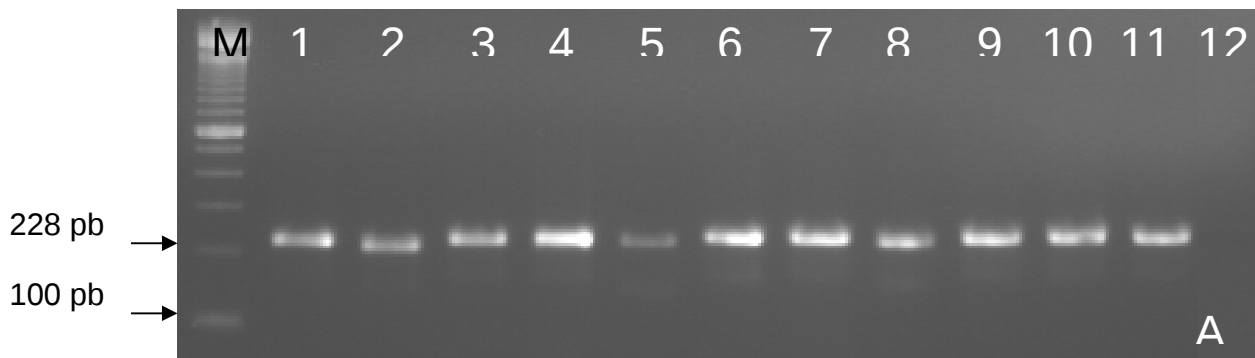


Figura 4. Detecção de diferentes estirpes do VBI testadas pelas técnicas de IC-RT-PCR (A) e RT-PCR convencional (B). Legenda: (M) Marcador 100bp (Invitrogen), (1) M41, (2) Connecticut, (3) Iowa 97, (4) Iowa 609, (5) SE-17, (6) IBVSC01, (7) IBVPR08, (8) IBVPR03, (9) IBVPR07, (10) IBVSP02, (11) IBVSP03, (12) Controle negativo.

5.4. Detecção do VBI em aves infectadas experimentalmente

As técnicas de IC-RT-PCT e RT-PCR convencional foram capazes de detectar a presença das três diferentes estirpes do VBI investigadas, na maioria das amostras teciduais analisadas. Assim, foram encontradas 32 amostras positivas em um total de 35 amostras testadas e ambas as técnicas moleculares utilizadas revelaram a presença do VBI, uma vez que houve a amplificação específica do fragmento de 228 pb.

Na infecção experimental com a estirpe M41 do VBI, as técnicas moleculares (IC-RT-PCR e RT-PCR convencional) detectaram o fragmento do gene S1 (228 pb) em 11 de 14 amostras teciduais testadas (**Figura 5**). Na análise comparativa, verificou-se que apenas oito dessas amostras foram positivas, isto é, induziram o desenvolvimento de lesões embrionárias características nos ovos inoculados (**Tabela 3**).

Nas amostras dos grupos infectados com a estirpe IBVSC01 e com a estirpe IBVPR03, á semelhança dos resultados do grupo anteriormente analisado, as técnicas moleculares empregadas no presente estudo levaram à amplificação do fragmento específico do gene S1 (228 pb) em todas as amostras testadas (21) (**Figura 6 e 7**), enquanto que o IV apresentou resultados positivos apenas para 14 amostras, sendo 10 delas provenientes das aves infectadas com a estirpe IBVSC01 e apenas 4 das amostras do grupo infectado com a estirpe IBVPR03 (**Tabela 3**).

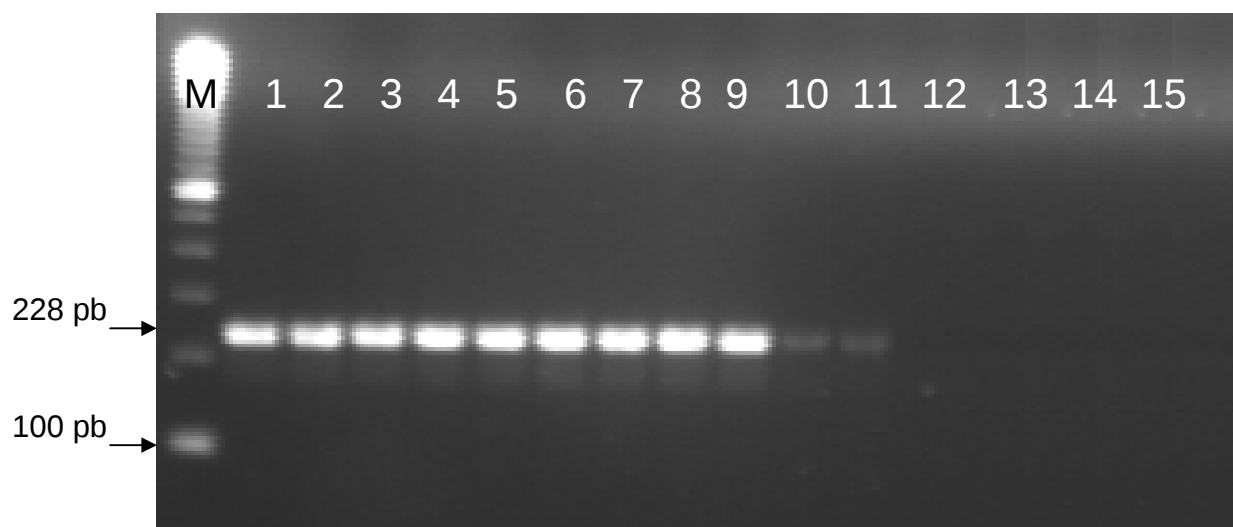
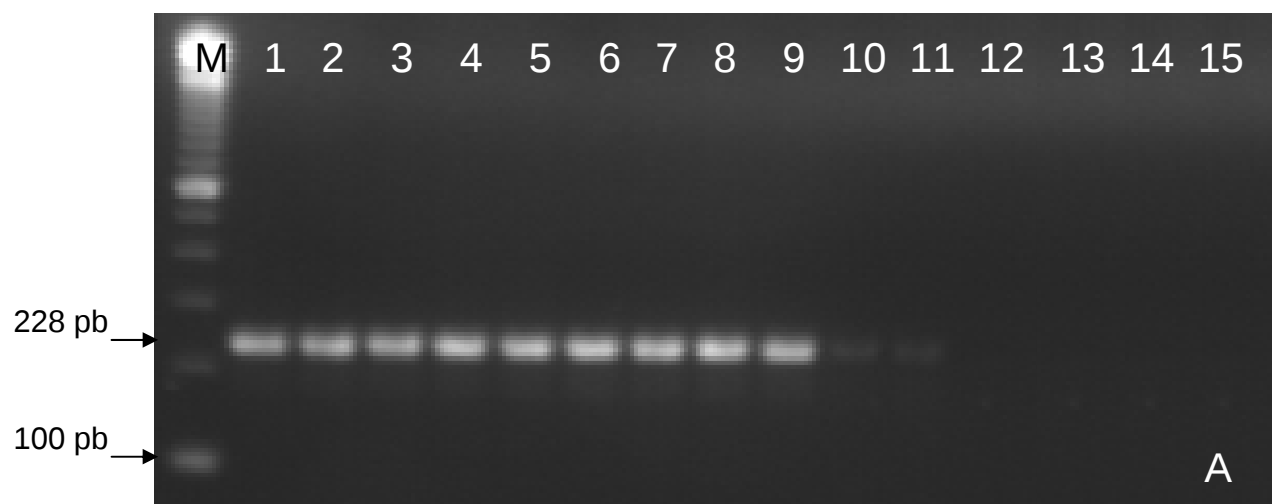


Figura 5. Detecção do VBI, através das técnicas de IC-RT-PCR (A) e RT-PCR convencional (B), em amostras de pulmão de aves infectadas experimentalmente com a estirpe M41 do VBI. Legenda: (M) Marcador 100bp (Invitrogen), (1 a 14) amostras de pulmão de aves infectadas experimentalmente (fase aguda), (12) Controle negativo.

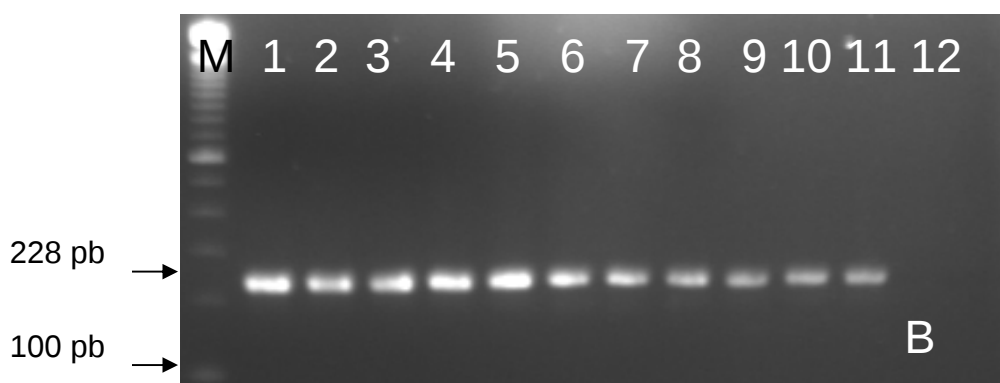
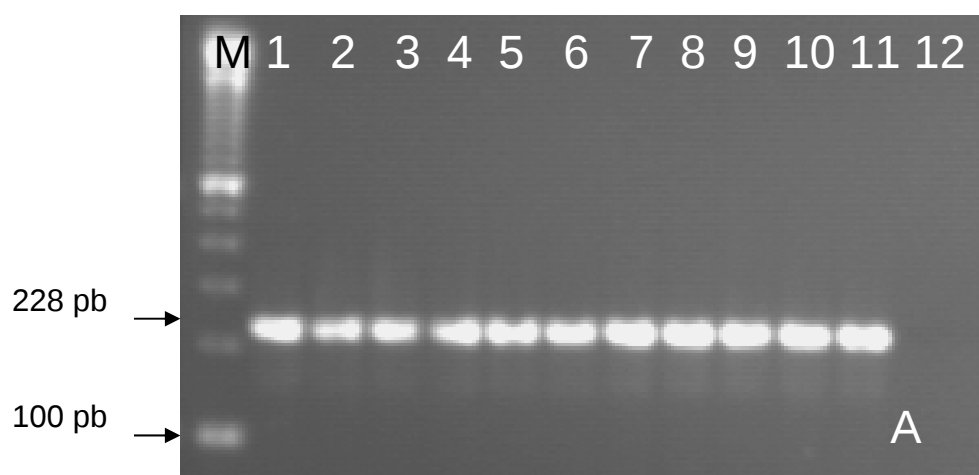
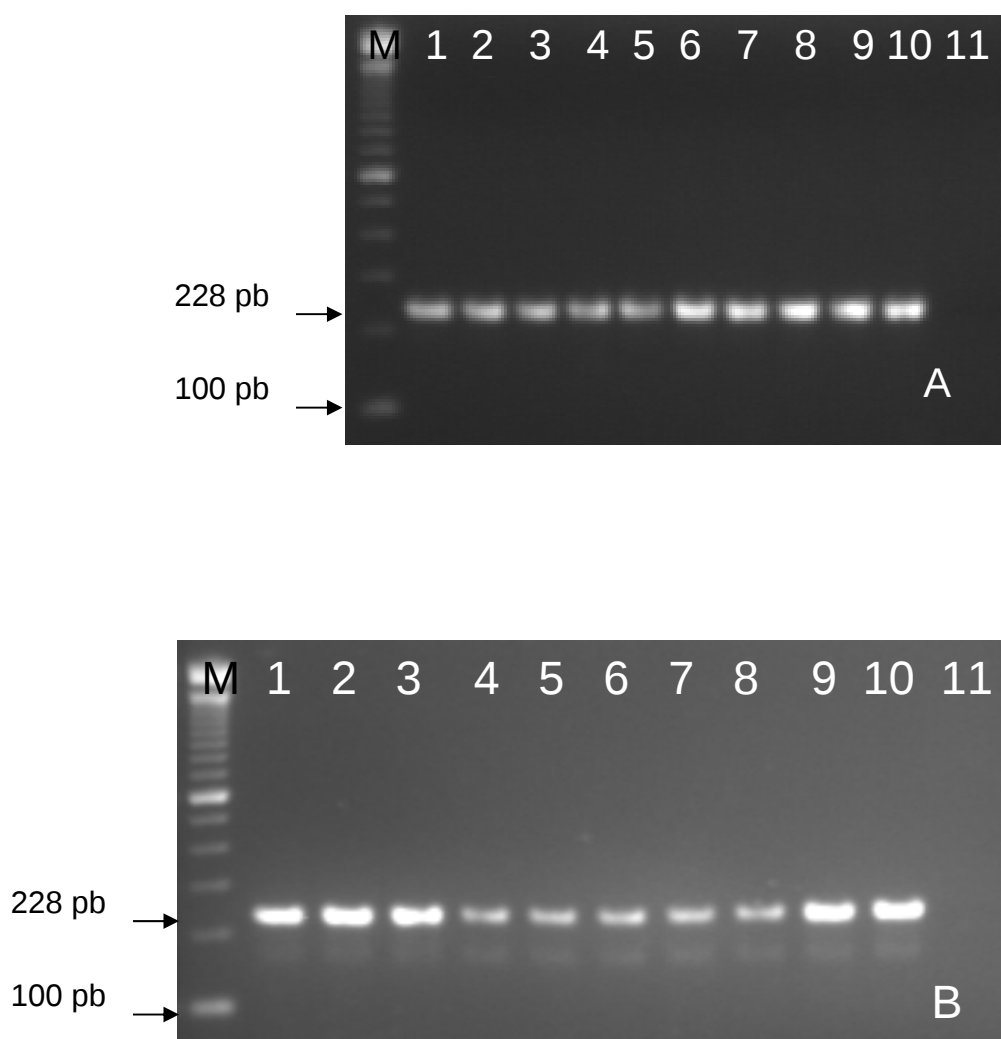


Figura 6. Detecção do VBI, através das técnicas de IC-RT-PCR (A) e RT-PCR convencional (B), em amostras de pulmão de aves infectadas experimentalmente com o isolado de campo IBVSC01 do VBI. Legenda: (M) Marcador 100bp (Invitrogen), (1 a 11) amostras de pulmão de aves infectadas experimentalmente (fase aguda), (12) Controle negativo.



5.5. Análise por RFLP das estirpes de referência e isolados de campo

A digestão do produto amplificado de 228 pb da extremidade 5' do gene S1 com a enzima de restrição *AluI*, permitiu a identificação de 3 diferentes padrões de mapas de restrição; sendo que o genótipo 1 foi associado à estirpe de referência M41 e ficou constituído pelas estirpes M41, Iowa 97 e Iowa 609, o genótipo 2 foi associado à estirpe de referência Connecticut, sendo composto apenas por esta estirpe e o genótipo 3 contendo também um único vírus foi vinculado à estirpe de referência SE-17, cujo amplicon não sofreu nenhuma clivagem (**Figura 8**). Mapas semelhantes de restrição foram observados para a clivagem com esta mesma enzima dos amplicons de 228 pb do gene S1 provenientes dos isolados de campo aqui estudados, sendo que os vírus IBVSC01, IBVPR03 e IBVPR07 foram agrupados no genótipo 1 (M41), enquanto que os isolados IBVSP02 e IBVSP03 apresentaram características do genótipo 3 (estirpe SE-17) e o isolado IBVPR08 foi classificado no genótipo 2 (Connecticut) (**Figura 10**).

No caso da análise dos mapas de restrição com a enzima *MobII* do fragmento correspondente à extremidade 5' do gene S1, as estirpes de referência foram também classificadas nos mesmos 3 genótipo distintos e que foram descritos acima, cuja composição foi a mesma observada para a digestão com a enzima *AluI* (**Figura 9**). Já os produtos amplificados do gene S1 provenientes dos isolados de campo, ao serem submetidos à digestão com a enzima *MobII*, revelaram 4 padrões distintos de restrição, sendo que os vírus IBVSC01, IBVPR03 e IBVPR07 foram agrupados ao genótipo 1, enquanto que os vírus IBVSP02 e IBVSP03 foram reunidos no genótipo 3 e o vírus IBVPR08 apresentou um perfil de digestão diferente dos outros 3 genótipos que haviam sido identificados e formou um novo genótipo (**Figura 11**).

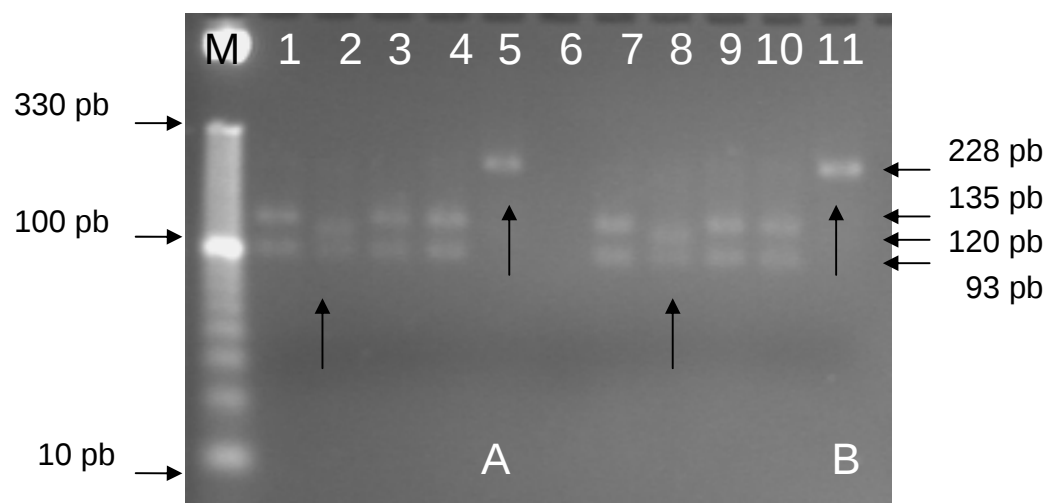


Figura 8. Diferenciação das estirpes de referência do VBI, através da reação de RFLP de produtos idênticos de PCR obtidos por técnicas diferentes, IC-RT-PCR (A) e RT-PCR convencional (B) com a enzima *A**lu**I*. Legenda: (M) Marcador 10bp (Invitrogen), (1) M41, (2) Connecticut, (3) Iowa 97, (4) Iowa 609, (5) SE-17, (6) Controle Negativo, (7) M41, (8) Connecticut, (9) Iowa 97, (10) Iowa 609, (11) SE-17.

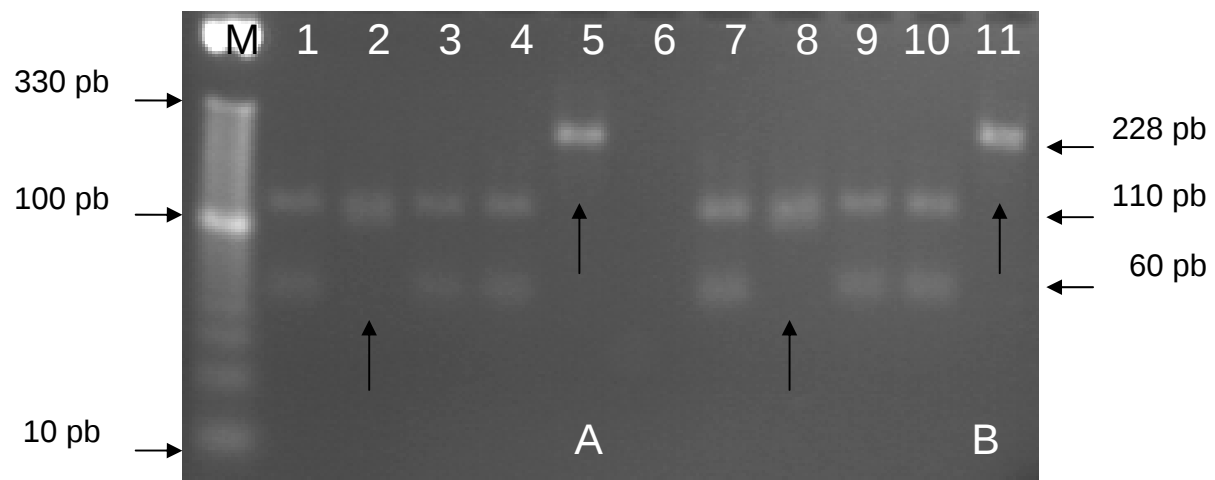


Figura 9. Diferenciação das estirpes de referência do VBI, através da reação de RFLP de produtos idênticos de PCR obtidos por técnicas diferentes, IC-RT-PCR (A) e RT-PCR convencional (B) com a enzima *MbolI*. Legenda: (M) Marcador 10bp (Invitrogen), (1) M41, (2) Connecticut, (3) Iowa 97, (4) Iowa 609, (5) SE-17, (6) Controle Negativo, (7) M41, (8) Connecticut, (9) Iowa 97, (10) Iowa 609, (11) SE-17.

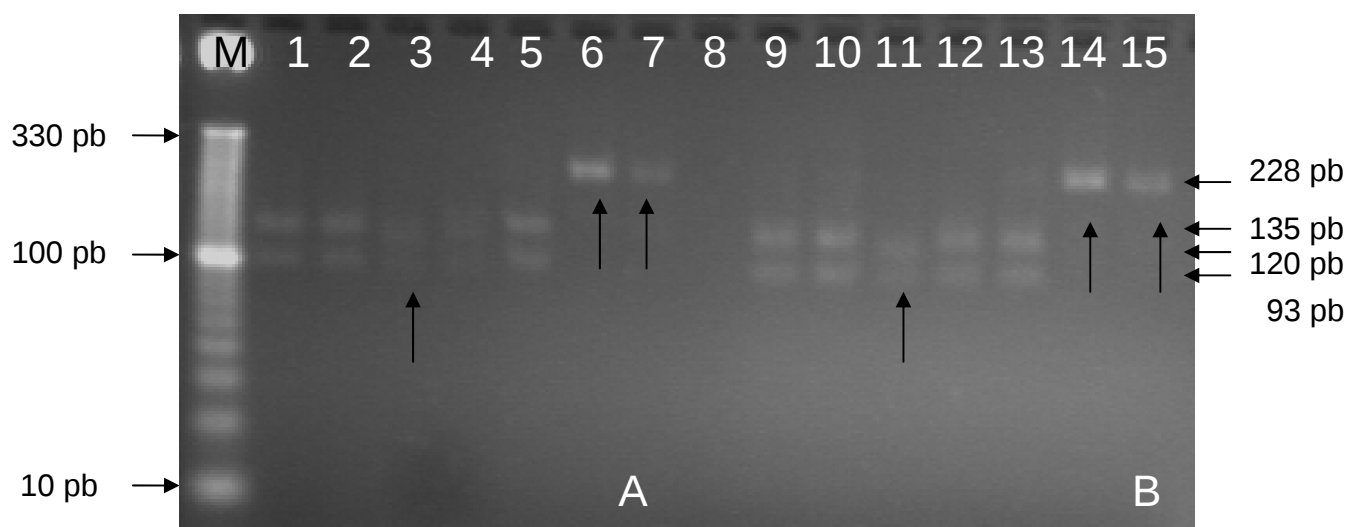


Figura 10. Diferenciação dos isolados de campo do VBI, através da reação de RFLP de produtos idênticos de PCR obtidos por técnicas diferentes, IC-RT-PCR (A) e RT-PCR convencional (B) com a enzima *A**lu*I. Legenda: (M) Marcador 10bp (Invitrogen), (1) M41, (2) IBVSC01, (3) IBVPR08, (4) IBVPR03, (5) IBVPR07 (6) IBVSP02, (7) IBVSP03, (8) Controle negativo, (9) M41, (10) IBVSC01, (11) IBVPR08, (12) IBVPR03, (13) IBVPR07 (14) IBVSP02, (15) IBVSP03.

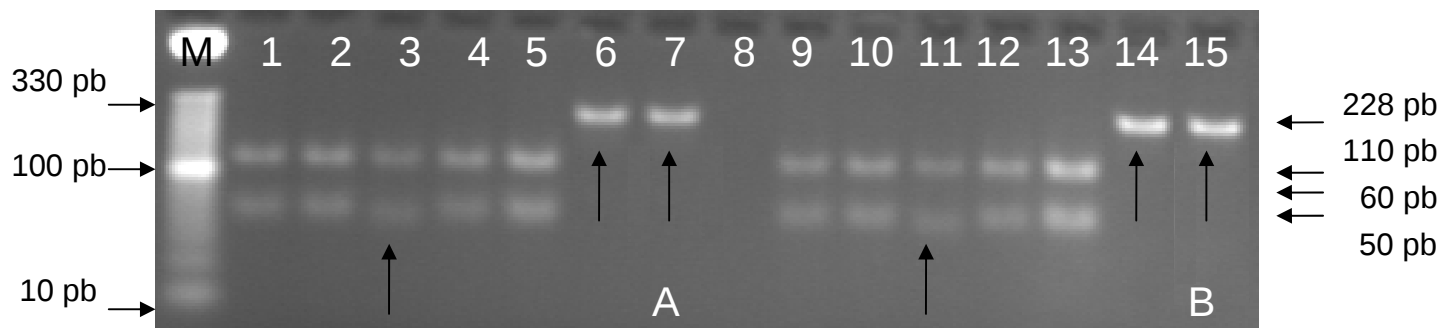


Figura 11. Diferenciação dos isolados de campo do VBI, através da reação de RFLP de produtos idênticos de PCR obtidos por técnicas diferentes, IC-RT-PCR (A) e RT-PCR convencional (B) com a enzima *Mbol*I. Legenda (M) Marcador 10bp (Invitrogen), (1) M41, (2) IBVSC01, (3) IBVPR08, (4) IBVPR03, (5) IBVPR07 (6) IBVSP02, (7) IBVSP03, (8) Controle negativo, (9) M41, (10) IBVSC01, (11)IBVPR08, (12) IBVPR03, (13) IBVPR07 (14) IBVSP02, (15) IBVSP03.

VI. DISCUSSÃO

O aparecimento de novas variantes do VBI é o maior obstáculo no controle da infecção causada por este patógeno (WANG & TSAI, 1996). Mudanças relevantes na antigenicidade e virulência deste vírus têm sido relatadas em vários países (WANG & TSAI, 1996; KING, 1988), de sorte que diversos estudos moleculares sobre o VBI têm demonstrado que variantes genéticas e antigênicas deste vírus, surgem a partir de recombinações naturais entre os genomas de diferentes estirpes do VBI e de alterações e mutações na seqüência do gene da glicoproteína S1 (COLLISON et al., 1990; CAVANAGH, 1995). É imperativo, então, que seja feita de forma rápida e acurada a detecção e a identificação da estirpe do VBI em aves suspeitas de terem sido acometidas por este patógeno em uma granja. Por outro lado, os métodos diagnósticos recomendados para serem usados no diagnóstico laboratorial do VBI são ainda complexos, laboriosos e demorados, devido, sobretudo, à necessidade de que várias passagens sejam feitas em ovos embrionados dos materiais preparados a partir de amostras colhidas de aves suspeitas de infecção para que os isolados de campo do VBI consigam produzir as lesões típicas nos embriões (CAVANAGH & NAQI, 2003).

Diante desta dificuldade, seria muito desejável que fosse desenvolvido e aplicado um método de diagnóstico molecular que conciliasse maior simplicidade e rapidez com elevadas especificidade e sensibilidade. A análise da literatura sugere que essa condição pode ser alcançada, quando se combina a captura deste patógeno viral através de um anticorpo específico adsorvido a uma fase sólida, tal como ocorre no método de *Sandwich*-ELISA, com a técnica de RT-PCR, configurando, assim, o método de IC-RT-PCR. Tal metodologia foi desenvolvida e aplicada com bons resultados na investigação em apreço, tendo sido usada,

primariamente, para a detecção do VBI em amostras de líquido coríó-alantoíde de ovos embrionados inoculados com o VBI e, posteriormente, em amostras de tecidos oriundos do trato respiratório de aves infectadas experimentalmente com este mesmo vírus.

A propósito, o método de IC-RT-PCR foi utilizado, pela primeira vez, por JANSEN et al. (1990) tendo sido realizado originalmente em tubos de polipropileno. Entretanto, neste estudo, decidiu-se adaptá-lo, tal como fizeram RODRIGUEZ et al. (1994) e GALL-RECULÉ et al. (2001) para microplacas de poliestireno, seguindo-se as recomendações de NOLASCO et al. (1993), a fim de simplificar os passos das lavagens da superfície sólida de captura desta reação.

Deve-se destacar, a priori, que no presente estudo, a reação de IC-RT-PCR padronizada para amplificar a porção 5' do gene S1, apresentou resultados similares aos da RT-PCR convencional, usada com a mesma finalidade, tanto no que concerne ao espectro de estirpes do VBI detectadas, como aos resultados de avaliação da especificidade e sensibilidade analíticas.

Dessa forma, somente uma região de 228 pb do gene S1 do VBI, delimitada pelos oligonucleotídeos C2U/C3L, foi amplificada pelas técnicas de IC-RT-PCR ou de RT-PCR convencional, a partir das amostras de LCA infectado com 11 diferentes estirpes do VBI, não havendo geração de nenhum produto amplificado a partir das amostras dos 4 vírus heterólogos testados, o que confirmou um bom nível de especificidade dos métodos moleculares aqui empregados (**Figura 2**).

Nesse sentido, pode-se concluir que a seleção dos oligonucleotídeos iniciadores aqui utilizados, foi bastante apropriada, contribuindo sobremaneira para que fossem alcançados os bons resultados acima citados na detecção específica do VBI, uma vez que tais reagentes são fundamentais para conferir maior especificidade e sensibilidade às técnicas de RT-PCR, conforme foi destacado por KHO et al. (2000), HANDBERG et al. (1999), ZWAAGSTRA et al. (1992).

Ainda, dentro do mesmo contexto acima mencionado, deve-se salientar que achados similares realçando as elevadas sensibilidade e especificidade da RT-

PCR com o mesmo par de oligonucleotídeos empregado nesse estudo foram observados por WANG & TSAI (1996), que obtiveram bons resultados na amplificação dessa mesma região gênica, que coincidentemente foi o alvo da amplificação em nosso trabalho, utilizando a técnica convencional de RT-PCR para a detecção e genotipagem de 4 estirpes de referência e de 25 isolados de campo de Taiwan. A explanação mais plausível para tais resultados é que, inclusive, é defendida pelos autores supracitados, deve-se ao fato de que esses oligonucleotídeos foram desenhados para duas regiões que apresentam um maior grau de conservação na sequência de nucleotídeos que compõe o gene da glicoproteína S1; podendo ser considerados, portanto, oligonucleotídeos “universais” para a detecção do VBI.

Em adição a isso, tais oligonucleotídeos têm a vantagem de flanquear uma região altamente variável e importante para a caracterização de variantes do VBI; a qual é denominada de hipervariável 1 (HV1) (WANG & TSAI, 1996). Portanto as propriedades desse par de oligonucleotídeos forneceram as condições ideais para que fosse atingida uma excelente sensibilidade nos diferentes métodos de biologia molecular aqui empregados.

Deve-se destacar também que estes oligonucleotídeos atuaram no sentido de evitar que houvesse influência negativa sobre a especificidade dessas mesmas técnicas, o que ficou claramente demonstrado em face dos resultados negativos observados na tentativa de amplificação de amostras contendo um dos quatro patógenos virais heterólogos de aves aqui ensaiados (APV dos grupos A e B, VDN e GDV).

A par disso tudo, pode-se supor também que o bom nível de sensibilidade encontrado neste estudo para a técnica de IC-RT-PCR foi também verificado para outros métodos de biologia molecular, que envolvem a captura de partículas virais seguindo-se a aplicação da RT-PCR para a detecção de patógenos virais de animais (RODRIGUEZ et al., 1994; GALL-RECUÉ et al., 2001). Apesar disso, na investigação em apreço não foi demonstrado nenhum incremento de sensibilidade comparativamente ao método convencional de RT-PCR, uma vez que foram

observados resultados idênticos de sensibilidade nessa última técnica, onde o RNA viral foi obtido através do protocolo tradicional onde a extração se faz com agentes caotrópicos e mistura fenol-clorofórmio-álcool isoamílico, seguindo-se precipitação com álcool isopropílico e lavagem com etanol.

De qualquer sorte ficou claro, nesse trabalho, que a sensibilidade analítica encontrada para os dois métodos foi bastante elevada, havendo detecção do vírus até a diluição de 10^{-5} da estirpe M41 do VBI (**Figura 3**); porém ela foi menor do que a encontrada por GRAFF et al. (1993), que relataram à detecção específica do Vírus da Hepatite A em espécimens fecais obtidos de macacos e pacientes com Hepatite A da Carolina do Norte, pela técnica de IC-RT-PCR até a diluição de 10^{-7} .

No entanto, deve-se interpretar com cautela essas diferenças acima relatadas, pois o LCA infectado com o VBI e as amostras fecais contendo o vírus da hepatite A tratam-se de materiais que, de início, apresentam concentrações distintas de cada um desses vírus, explicando, em princípio, a razão pela qual os autores citados anteriormente conseguiram uma sensibilidade 100 vezes maior do que foi alcançada no estudo em apreço.

O método de IC-RT-PCR apresenta também alta sensibilidade analítica quando comparada com outras técnicas sorológicas, tais como o ELISA-Teste (JACOBI et al., 1998; GALL-RECUÉ et al., 2001; HEMA et al., 2003; YU et al., 2005) e, não obstante, neste estudo não ter sido feita uma comparação entre a performance deste método molecular com a de um teste sorológico como o ELISA, MONTASSIER et al. (2006b) relataram que um método similar ao de IC-RT-PCR, isto é, o de Lectina-Captura-RT-PCR, foi bem mais sensível do que o teste de Concanavalina A-Sandwich-ELISA para a detecção do VBI em amostras biológicas infectadas experimentalmente.

Em relação aos resultados obtidos na detecção do VBI em amostras teciduais colhidas de aves na fase aguda da infecção experimental com a estirpe M41, ficou claro que os métodos de biologia molecular (IC-RT-PCR e RT-PCR convencional) adotados revelaram a presença deste vírus em 11 das 14 amostras

teciduais analisadas (78,6%) (**Figura 5**), enquanto que a técnica do isolamento viral foi capaz de detectar o VBI em 8 dessas 14 amostras (57,14%) (**Tabela 3**).

Situação semelhante à acima descrita, porém com resultados nitidamente mais favoráveis ao isolamento viral, ocorreu na análise das amostras provenientes das aves infectadas com a estirpe IBVSC01, sendo observada uma positividade para 10 das 11 amostras testadas (90.9%) (**Tabela 3**), ao passo que as técnicas moleculares amplificaram o fragmento específico da extremidade 5' do gene S1 para todas as 11 amostras ensaiadas (**Figura 6**).

No entanto, os resultados encontrados na análise das amostras teciduais colhidas de aves infectadas com a estirpe IBVPR03, apresentaram diferenças marcantes e interessantes, pois, enquanto as técnicas moleculares demonstraram a presença do VBI em todas as 10 amostras teciduais testadas (**Figura 7**), o isolamento viral só detectou 4 dessas amostras como positivas (40%) (**Tabela 3**).

O conjunto de todos esses resultados reforçam, dessa maneira, os achados anteriores relativos à avaliação de uma sensibilidade analítica mais elevada para as técnicas moleculares, bem como confirmam os métodos de IC-RT-PCR e RT-PCR convencional desenvolvidos e aplicados nesse experimento, apresentam efetivamente uma maior sensibilidade quando comparadas com a técnica de isolamento viral em ovos embrionados de galinhas. Deve-se destacar que resultados similares demonstrando que as técnicas moleculares possuem uma maior sensibilidade do que o método de isolamento do VBI têm sido demonstrados e são explicados em razão de aprimoramentos recentes por que têm passado os métodos moleculares desde a extração do RNA e, incluindo-se aí, os procedimentos de RT-PCR realizados segundo os protocolos convencionais ou por meio da metodologia de tempo real (HANDBERG et al., 1999, CALLISON et al., 2006, OKINO & MONTASSIER 2006).

Uma explicação plausível para o fato de algumas amostras terem revelado resultados negativos na técnica de isolamento viral e positivos nas reações de IC-RT-PCR e de RT-PCR convencional seria a de que o VBI pode depois de terem sido coletadas as amostras teciduais, sofrer redução de sua infectividade. Além

disso, há de se considerar o efeito negativo da possível presença de anticorpos anti-VBI nos tecidos homogeneizados interferirem no isolamento viral (DHINAKAR & JONES, 1996). Deve-se salientar, também, neste caso, que não foi observada situação oposta, isto é, amostras teciduais que revelassem a presença do VBI no isolamento viral e não apresentassem produtos amplificados nas técnicas de IC-RT-PCR e RT-PCR convencional.

No entanto, deve-se interpretar com cuidado os resultados acima descritos e não se considerar, de forma definitiva, que a técnica de IV foi pouco eficiente ou até mesmo ineficiente na detecção do VBI presente nas amostras de pulmão colhidas de aves na fase aguda de infecção experimental com este vírus, pois desempenho similar dessa metodologia foi observado em investigações anteriores. Assim, verifica-se que os resultados deste estudo foram compatíveis com os encontrados por OWEN et al. (1991), que detectaram a estirpe H52 do VBI, através do IV em amostras de traquéia no terceiro, quinto, sétimo e décimo dias pós-infecção.

Achados similares aos relatados acima, também foram descritos por BRONZONI (1999), no desenvolvimento de um estudo de infecção experimental com a estirpe M41 do VBI, no qual as aves foram infectadas aos 14 dias de idade com um título infectante de $10^{6,7}$ DIE₅₀/mL, sendo que o VBI foi isolado entre o terceiro e o décimo dias pós-infecção, em amostras de traquéia e pulmão. LUCIO & FABRICANT (1990) realizaram um estudo sobre o tropismo de três isolados cloacais do VBI em relação à amostra M41, obtendo resultados do IV da estirpe M41 em amostras de traquéia e pulmão que também são coincidentes com os resultados obtidos neste estudo, com IV até o nono dia pós-infecção. BHATTACHARJEE et al. (1994) utilizando o método de cultura de órgão traqueal (TOC), em diferentes concentrações de VBI inoculadas, concluíram que quanto maior a dose infectante na infecção experimental, mais precocemente o VBI pode ser detectado. Dessa forma, com uma dose infectante de $10^{4,5}$ os autores conseguiram detectar ciliostase nos anéis traqueais entre 6 e 24 horas pós-infecção.

No presente estudo, a baixa sensibilidade do isolamento viral para as amostras provenientes do grupo infectado com a estirpe IBVPR03 pode estar relacionada ao diferente tropismo deste isolado de campo, em comparação com as outras estirpes estudadas (M41 e IBVSC01). Estudo recente revelou que após infecção experimental desta estirpe através de via óculo/nasal, não foi possível a observação de sinais clínicos evidentes. E, através das técnicas de ciliostase e histopatologia, também não foi possível a observação de lesões relevantes no epitélio traqueal, mas foram encontradas lesões histopatológicas nas gônadas. Devido a isto, as lesões encontradas nas gônadas do isolado IBVPR03 sugerem que essa estirpe possui tropismo para os tecidos das gônadas (ovários e testículos) e, ao contrário da M41, não possui um tropismo respiratório acentuado (PEREIRA et al., 2006). Contudo, as técnicas de IC-RT-PCR e de RT-PCR convencional empregadas no estudo em apreço demonstraram que tal vírus se replicou, ainda que com menor intensidade, nos tecidos respiratórios, em uma escala que foi suficiente para que fosse amplificado o fragmento 5'-proximal do gene S1 nas técnicas moleculares aqui usadas.

Com respeito, ainda, a esses resultados divergentes entre o isolamento viral e as técnicas moleculares na detecção do VBI, LUCIO & FABRICANT (1990) sugerem que diferenças no comportamento desse patógeno em relação ao isolamento viral em diferentes tecidos poderiam ser causadas pelo baixo título viral na amostra tecidual, pela diminuição da adaptação embrionária quando re-inoculada em aves, ou ainda, pela diversidade de respostas do hospedeiro à infecção. A possibilidade de que outras células, além daquelas encontradas no trato respiratório, digestivo ou renal, possam ser infectadas pelo VBI também é ressaltada por estes autores. Tal fato reforça a necessidade de incluir vários tipos de tecidos ao se tentar isolar ou detectar o VBI a partir de isolados de campo. Os autores concluíram que tonsila cecal, rins, traquéia, pulmões e esôfago devem ser incluídos na rotina de exames de diagnóstico voltados ao isolamento do VBI. Por esta razão, FALCONE et al. (1997) utilizaram, na aplicação de RT-PCR e Nested-PCR para a detecção do VBI, amostras teciduais coletadas de aves naturalmente

infectadas, sendo que cada amostra foi constituída de um pool de tecidos oriundos da traquéia, pulmão, rins e tonsila cecal.

De qualquer forma, para se alcançar um diagnóstico laboratorial mais efetivo do VBI, é importante que sejam colhidas e processadas amostras provenientes de mais de um tipo de órgão ou de tecido devido ao fato de que há variantes do VBI com diferentes tropismos teciduais e de capacidade de persistência nesses mesmos órgãos ou tecidos, tanto quando se consideram as técnicas de biologia molecular como o isolamento viral em ovos embrionados SPF (GELB & JACKWOOD, 1998; CAVANAGH & NAQI, 2003).

Em contraste com os procedimentos da RT-PCR convencional, algumas vantagens da reação de IC-RT-PCR, referem-se à diminuição do número de passos, à redução no risco de contaminação entre amostras, ao fato de evitar a manipulação de produtos tóxicos, usados na extração de RNA viral e de proporcionar uma maior rapidez na execução e na obtenção de resultados tal como haviam relatado JANSEN et al. (1990).

A diferenciação entre as estirpes do VBI utilizadas neste estudo foi obtida através da técnica de RFLP; pela qual os produtos amplificados da região de 228 pb da extremidade 5' do gene S1 obtidos pelas técnicas de IC-RT-PCR e RT-PCR convencional foram submetidos à digestão com as enzimas *AluI* e *MboII*, descritas por WANG & TSAI (1996). Dessa maneira, foram identificados 4 padrões distintos nos mapas de restrição, os quais puderam ser associados ou a estirpe M41, ou a estirpe Connecticut, ou a estirpe SE-17, ou ainda ao isolado de campo IBVPR08.

Assim, as estirpes utilizadas neste estudo, quando analisadas com essas duas enzimas, apresentam genótipos idênticos ao da estirpe M41, indicando que os isolados de campo presentes neste grupo parecem ter origem ou são de fato vírus vacinais e devem ser classificados no grupo 1. Já, os grupos correspondentes aos genótipos 2 e 3 das estirpes de referência apresentaram genótipos diferentes aos da estirpe M41, evidenciando alta variabilidade entre estas estirpes, enquanto que os grupos 2, 3 e 4 dos isolados de campo apresentaram padrões distintos de RFLP, quando comparados ao da estirpe M41.

O conjunto desses achados indica que há grande variabilidade na região 5'-proximal do gene codificador da glicoproteína S1 entre os isolados de campo do VBI provenientes de diferentes regiões do Brasil, tal como havia sido observado por MONTASSIER et al. (2006a).

A propósito, é interessante destacar que WANG & TSAI (1996) em estudo sobre a mesma região do gene S1 proveniente de estirpes isoladas de campo em Taiwan, observaram também uma enorme variabilidade entre as estirpes analisadas, tendo sido identificados pela RFLP, com 5 enzimas de restrição, um total de 8 genótipos diferentes daqueles apresentados pelas 4 estirpes de referência utilizadas por esses mesmos autores; no caso, a H120, Connecticut, JMK e Holte.

OKINO (2007) ao analisar a mesma região gênica pela técnica de RT-PCR em tempo real de algumas estirpes de referência do VBI e incluindo alguns dos mesmos isolados de campo do Brasil aqui investigados, encontraram também uma variabilidade elevada, sendo que as estirpes / isolados foram agrupados com base na avaliação da temperatura de dissociação (T_m) dos fragmentos amplificados para cada um desses vírus. Dessa forma, os isolados IBVSC01, IBVPR03 e o IBVPR07 agruparam ao sorotipo Massachussets (M41) ficando em dois outros grupos separados as estirpes de referência Connecticut e SE-17, confirmando com isso parte dos resultados obtidos neste estudo.

Além disso, os achados observados por MONTASSIER et al. (2006a) na análise filogenética a partir das seqüências de nucleotídeos de uma região análoga e compreendendo a extremidade 5' do gene S1 dos mesmos isolados de campo do VBI aqui investigados, levaram a reunião desses vírus em grupos de composição similar aos aqui delimitados, especialmente, no que concerne àqueles que apresentam maior identidade com o genótipo Massachussets. Sendo assim, estes resultados e a especificidade das técnicas de IC-RT-PCR e RFLP caracterizam o seu grande potencial para fazer a detecção e diferenciação de isolados de campo em relação às estirpes de referência vacinal.

Pode-se concluir com base em todo o conjunto de resultados obtidos no presente estudo, que a técnica de IC-RT-PCR, aqui desenvolvida, foi tão eficiente na detecção de estirpes do VBI presentes em amostras de LCA ou em amostras teciduais de aves infectadas experimentalmente, como a técnica de RT-PCR convencional e ambas foram mais eficientes do que a técnica de IV. Ademais, o produto final da amplificação por quaisquer dessas técnicas foi utilizado com sucesso para a realização de outro método de análise molecular, isto é, a RFLP, com o objetivo de fazer a diferenciação entre estirpes deste vírus. Diante disso, a IC-RT-PCR pode ser considerada um método sensível e específico que se revelou adequado para ser utilizado com vantagens significativas no diagnóstico direto desse vírus; tanto na detecção como na diferenciação prévia de genótipos, por conciliar a especificidade da imunocaptura com a sensibilidade da reação de PCR. Dessa forma, essa nova metodologia ora desenvolvida pode proporcionar ganho de tempo, redução no risco de contaminação entre amostras e pode contribuir significativamente com os estudos de epidemiologia molecular do VBI.

VII. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A técnica de IC-RT-PCR é eficiente para ser usada no diagnóstico direto do VBI, tanto para a detecção como para a diferenciação prévia de variantes deste vírus.

- A sensibilidade e especificidade analítica da técnica IC-RT-PCR para a detecção do VBI foi idêntica ao do método de RT-PCR convencional e maior do que a técnica de isolamento viral.

- A combinação do método de RFLP com a técnica de IC-RT-PCR foi capaz de discriminar diferentes estirpes do VBI classificando-as em genótipos distintos, com base nos mapas de restrição obtidos a partir do fragmento do gene S1 amplificado.

- A técnica de IC permite a obtenção de RNA molde que pode ser processado e amplificado pela RT-PCR, podendo então substituir o método convencional de extração de RNA viral.

VIII. REFERÊNCIAS

ABDEL-MONEIM, A. S.; EL-KADY, M. F.; LADMAN, B. S.; GELB, J. Jr. S1 gene sequence analysis of a nephropathogenic strain of avian infectious bronchitis virus in Egypt. **Virol.**, London, v. 78, n. 3, p. 1-9, 2006.

ADZAR, A.; SHAW, K.; BRINTON, P.; CAVANAGH, D. Universal oligonucleotides for the detection of infectious bronchitis virus by the polymerase chain reaction. **Avian Pathol.**, Cambs, v. 25, n. 4, p. 817-836, 1996.

ADZAR, A.; GOUGH, R. E.; HAYDON, D.; SHAW, K.; BRITTON, P.; CAVANAGH, D. Molecular analysis of the 793/B serotype of infectious bronchitis virus in Great Britain. **Avian Pathol.**, Cambs, v. 26, n. 3, p. 625-640, 1997.

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

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

BOURSNELL, M. E. G.; BROWN, T. D. K.; FOULDS, I. J.; GREEN, P. F.; TOMLEY, M. F.; BINN, M. M. Completion of the sequence of the genome of the coronavirus avian infectious bronchitis virus. **J. Gen. Virol.**, Reading, v. 68, n. 1, p. 57-77, 1987.

BRONZONI, R. V. M. **Desenvolvimento e aplicação de ensaios imunoenzimáticos (Competitivo-ELISA, Duplo Anticorpo-ELISA e Sandwich-ELISA-Concanavalina A) para a detecção do vírus da bronquite infecciosa em tecidos de aves experimentalmente infectadas.** 1999. 120 f. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1999.

CALLISON, S. A.; HILT, D. A.; BOYNTON, T. O.; SAMPLE, B. F.; ROBISON, R.; SWAYNE, D. E.; JACKWOOD, M. W. Development and evaluation of real-time Taqman RT-PCR assay for the detection of infectious bronchitis virus from infected chickens. **J. Virol. Methods**, Amsterdam, v. 138, n. 1-2, p. 60-65, 2006.

CAPUA, I.; MINTA, Z.; MAWDITT, P. K.; BRITTON, P.; CAVANAGH, D.; GOUGH, R.E. Co-circulation of four types of infectious bronchitis virus (793/B, 624/I, B1648 and Massachusetts). **Avian Pathol.**, Cambs, v. 28, n. 5, p. 587-592, 1999.

CAVANAGH, D. Structural polypeptides of coronavirus IBV. **J. Gen. Virol.**, Reading, v. 53, n. 1, p. 93-1031, 1981.

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

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

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

CAVANAGH, D. Coronavírus na avicultura. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2005, Santos. **Anais...** Santos: FACTA, 2005. p.139-150.

CAVANAGH, D.; BRIEN, D. A.; BRINTON, M.; ENJUANES, L.; HOLMES, K. V.; HORZINEK, M. C.; LAI, M. M. C.; LAUDE, H.; PLAGEMANN, P. G. W.; SIDDELL, S.; CAVANAGH, D.; NAQI A. Infectious Bronchitis. In: CALNEK, B.W. **Diseases of poultry**. 10. ed. Ames: Iowa State University Press, 1997. p. 511-526.

CAVANAGH, D.; NAQI, S. A. Infectious Bronchitis. In : CALNEK, B.W., BARNES, H.J., BEARD, C.W. **Diseases of poultry**. 11. ed. Ames: Iowa State University Press, 2003. p. 101-119.

COLLISSON, E. W.; LI, J.; SNEED, L. W.; PETERS, M. L.; WANG, L. Detection of avian infectious bronchitis using in situ hybridization and recombinant DNA. **Vet. Microbiol.**, Amsterdam, v. 24, n. 3, p. 261-271, 1990.

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

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

COOK, J. K. A.; SARAH, J. O.; MARTYN, A. W.; MICHAEL, B. H. Breadth of protection of the respiratory tract provided by different live-attenuated infectious bronchitis virus of heterologous serotypes. **Avian Pathol.**, Cambs, v. 28, n. 5, p. 477-485, 1999.

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

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

DI FABIO, J.; ROSSINI, L. I.; ORBEL, S. J.; PAUL, G.; HUGGINS, M. B.; MALO, A.; SILVA, B. G.; COOK, J. K. Characterization of infectious bronchitis viruses isolated from outbreaks of disease in commercial flocks in Brazil. **Avian Dis.**, Kennet Square, v. 44, n. 3, p. 582-589, 2000.

FALCONE, E.; D`AMORE, E.; di TRANI, L.; TOLLIS, M. Rapid diagnosis of avian infectious bronchitis virus by the polymerase chain reaction. **J. Virol. Methods.**, Amsterdam, v. 64, n. 2, p. 125-130, 1997.

GALL-RECUÉ, G. L.; ZWINGELSTEIN, F.; PORTEJOIE, Y.; GALL, G. Immunocapture-RT-PCR assay for detection and molecular epidemiology studies of Rabbit Haemorrhagic Disease and European Brown Syndrome viruses. **J. Virol. Methods**, Amsterdam, v. 97, n. 1-2, p. 49-57, 2001.

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

GELB Jr., J.; JACKWOOD, M. W. Infectious Bronchitis. In: SWAYNE, D. E.; GLISSON, J. R.; JACKWOOD, M. W.; PEARSON, J. E.; REED, W. M. (Ed.), **A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathologists**, 1998, p. 169-174.

GRAFF, J.; TICEHURST, J.; FLEHMING, B. Detection of hepatitis A virus in sewage sludge by antigen capture polymerase chain reaction. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 59, n. 10, p. 3165-3170, 1993.

HANDBERG, K. J.; NIELSEN, O. L.; PEDERSEN, M. W.; JORGENSEN, P. H. Detection and strain differentiation of infectious bronchitis virus in tracheal tissues from experimentally infected chickens by reverse transcription-polymerase chain reaction. Comparison with an immunohistochemical technique. **Avian Pathol.**, Cambs, v. 28, n. 4, p. 327-35, 1999.

HEMA, M.; KIRTHI, N.; SREENIVASULU, P.; SAVITHRI, H. S. Development of recombinant coat protein antibody based IC-RT-PCR for detection and discrimination of sugarcane streak mosaic virus isolates from Southern Índia. **Arch. Virol.**, Vienna, v. 148, n. 6, p. 1158-1193, 2003.

HIPÓLITO, O. Isolamento e identificação do vírus da bronquite infecciosa das galinhas no Brasil. **Arq. Esc. Sup. Vet.**, Belo Horizonte, v. 10, p. 131-163, 1957.

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

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

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

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

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

JACOBI, V.; BACHAND, G. D.; HAMELIN, R. C.; CASTELO, J. D. Development of a multiplex immunocapture RT-PCR assay for detection and differentiation of tomato and tobacco mosaic tobamoviruses. **J. Virol. Methods**, Amsterdam, v. 74, n. 2, p. 167-178, 1998.

JANSEN, R. W.; SIEGL, G.; LEMOM, S. M. Molecular epidemiology of human hepatitis A virus defined by an antigen-capture polymerase chain reaction method. Proceedings of National. **Academy of Science.**, Washington, v. 87, p. 2867-2871, 1990.

JIA, W.; KARACA, K.; PARRISH, C. R.; NAQI, S. A. A novel variant of avian infectious bronchitis virus resulting from recombination among three different strains. **Arch. Virol.**, Vienna, v. 140, n. 2, p. 259-271, 1995.

JORGE, M. A.; RESENDE, J. S.; OLIVEIRA, R. L. Levantamento sorológico em frangos em Minas Gerais: doença de Gumboro, bronquite infecciosa e doença de Newcastle. **Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.**, Belo Horizonte, v. 44, n. 6, p. 545-547, 1992.

KANT, A.; KOCH, G.; ROOZELAAR, D. J van.; KURTERS, J. G.; POELWIJK, F. A.; van der ZEIJST, B. A. M. Location of antigenic sites defined by neutralizing

monoclonal antibodies on the S1 avian infectious bronchitis virus glycopolyptide. **J. Gen. Virol.**, Reading, v. 73, n. 3, p. 591-596, 1992.

KEELER, C. L.; REED, K. L.; NIX, W. A.; GELB, J. Serotype identification of avian infectious bronchitis virus by RT-PCR of the peplomer (S1) gene. **Avian Dis.**, Kennet Square, v. 42, n. 2, p. 275-284, 1998.

KHO, C. L.; MOHD-AZMI, M. L.; ARSHAD, S. S.; YUSOFF, K. Performance of an RT-nested PCR ELISA for detection of Newcastle disease virus. **J. Virol. Methods**, Amsterdam, v. 86, n. 1, p. 71-83, 2000.

KING, D. J. Identification of recent infectious bronchitis virus isolates that are serologically different from current vaccine strains. **Avian Dis.**, Kennet Square, v. 32, n. 2, p. 362-364, 1988.

KING, D. J.; CAVANAGH, D. Infectious Bronchitis. In: CALNEK, B.W.; BARNES, H.J.; BEARD, C.W.; REID, W.M.; YODER JUNIOR, H.W. **Diseases of poultry**. 9. ed. Ames: Iowa State University Press, 1991. p. 471-484.

KWOH, D. Y.; KWOH, T. J. Target amplification systems in nucleic acid-based diagnostic approaches. **Am. Biotechnol. Lab.**, v. 8, n. 13, p. 14-25, 1990.

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

KWON, H. M.; JACKWOOD, M. W.; BROWN, T. P.; HILT, D. A. Polymerase chain reaction and a biotin-labelled DNA probe for detection of infectious bronchitis virus. **Avian Dis.**, Kennet Square ,v. 37, p. 149-156, 1993a.

KUSTERS, J. G.; NIESTER, H. G; BLEUMINK-PLUYM, F. G; DAVELAAR, M. C.; HORZINEK, M. C.; van der ZEIJST, B. A. M. Molecular epidemiology of infectious bronchitis virus in the Netherlands. **J. Gen. Virol.**, Reading, v. 68, p. 343-352, 1987.

KUSTERS, J. G.; JAGER, E. J.; NIESTER, H. G.; van der ZEIJST, B. A. M. Sequence evidence for RNA recombination in field isolates of avian coronavirus infectious bronchitis virus. **Vaccine**, London, v. 8, n. 6, p. 605-608, 1990.

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

LEE, C. W.; JACKWOOD, M. W. Evidence of genetic diversity generated by recombination among avian coronavirus IBV. **Arch. Virol.**, Vienna, v. 145, n. 10, p. 2135-2148, 2000.

LIN, Z.; KATO, A.; KUDOU, Y.; UEDA, S. A new typing method for the avian infectious virus using polymerase chain reaction and restriction enzyme fragment length polymorphism. **Arch. Virol.**, Vienna, v. 116, n. 1-4, p. 19-31, 1991.

LUCIO, B.; FABRICANT, J. Tissue tropism of three cloacal isolates and Massachusetts strain of infectious bronchitis virus. **Avian Dis.**, Kennet Square, v. 34, n. 4, p. 865-870, 1990.

MARTINS, N. R. S. Alguns aspectos da etiopatogenia de bronquite infecciosa. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 1992, Santos. **Anais...** Santos: FACTA, 1992. p.145-150.

MEIR, R.; ROSENBLUT, R.; PERL, S.; KASS, N.; AYALI, G.; HEMSANI, E.; PERK, S. Identification of a novel nephropathogenic infectious bronchitis virus in Israel. **Avian Dis.**, Kennet Square, v. 48, n. 3, p. 632-641, 2004.

MONTASSIER, M. F. S.; BRENTANO, L.; RICHTZENHAIN, L. J.; MONTASSIER, H. J. Genetic diversity on S1 glycoprotein of avian infectious bronchitis virus strains isolated in Brazil between 1988-2000. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON AVIAN CORONA AND PNEUMOVIRUSES, 5., 2006a, Rauischholzhausen. **Anais...** p. 119-131.

MONTASSIER, M. F. S.; PIZA, V. M. T.; OKINO, C. H.; RICHTZENHAIN, L. J.; MONTASSIER, H. J. Lectin-Capture RT-PCR (LC-RT-PCR) for the diction of avian infectious bronchitis virus. In: V INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON AVIAN CORONA AND PNEUMOVIRUSES, 5., 2006b, Rauischholzhausen. **Anais...** p. 257-266.

MULLIS, K.; FALOONA, F. Specfic synthesis of DNA in vitro via a polymerase - catalysed chain reaction. **Methods Enzymol**, v. 155, p. 335-350, 1987.

MULLIS, K.; FALOONA, F.; SCHARF, S. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. **Cold. Spring. Harbor. Symp. Quant. Biol.**, Oakland, v. 51, n.1, p. 263-273, 1986.

MUMFORD, R. A.; SEAL, S. E. Rapid single-tube immunocapture RT-PCR for detection of two yam potyviruses. **J. Virol. Methods**, Amsterdam, v. 69, n. 1-2, p. 73-79, 1997.

MURPHY, F. H.; GIBBS, E. P. J.; HORZINEK, M. C.; STUDDERT, M. J. **Veterinary virology**. 3. ed. New York: Academic Press, 1999. p.495-509.

NOLASCO, G.; BLAS, C. de.; TORRES, V.; PONZ, F. A method combining immunocapture and PCR amplification in a microtiter plate for the detection of plant viruses and subviral pathogens. **J. Virol. Methods**, Amsterdam, v. 45, n. 2, p. 201-218, 1993.

OKINO, C. H. **Desenvolvimento da técnica de RT-PCR em Tempo Real para detecção e diferenciação de estirpes do Vírus da Bronquite Infecciosa das Galinhas**. 2007. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.

OKINO, C. H.; MONTASSIER, H. J. Detecção e diferenciação do vírus da Bronquite Infecciosa das Galinhas por RT-PCR em Tempo Real através do uso de SYBR GREEN I. **O Biológico**, São Paulo, v. 68, p. 152-154, 2006.

OWEN, R. L.; COWEN, B. S.; HATTEL, A. L.; NAQI, S. A.; WILSON, R. A. Detection of viral antigen following exposure of one-day-old chickens to the Holland-52 strain of IBV. **Avian Pathol.**, Cambs, v. 20, n. 4, p. 663-673, 1991.

PEREIRA, N. A.; ALESSI, A. C.; MONTASSIER, M. F. S.; MONTASSIER, H. J.; RICHTZENHAIN, L. J. Uma nova estirpe brasileira do vírus da bronquite infecciosa causadora de lesões gonadais e a proteção cruzada induzida pela vacina comercial atenuada. **O Biológico**, São Paulo, v. 68, 2006.

PIZA, V. M. T.; MONTASSIER, M. F. S.; CAETANO, A. G.; MONTASSIER, H. J.; BRENTANO, L. Desenvolvimento de uma nova abordagem da técnica de RT-PCR para a amplificação e caracterização do gene S1 de estirpes do vírus da bronquite infecciosa. CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 23., 2005, Santos. **Anais....**

REED, L. J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent end points. **Am. J. Hyg.**, Baltimore, v. 27, n. 3, p. 493-97, 1938.

RODRIGUEZ, A.; NUÑES, J. I.; NOLASCO, G.; PONZ, F.; SOBRINO, F.; BLAS, D. de. Direct PCR detection of foot-and-mouth disease virus. **J. Virol. Methods**, Amsterdam, v. 47, n. 3, p. 345-349, 1994.

SAIKI, R. K.; SCHARF, S.; FALOONA, F. Enzymatic amplification of β – globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, London, v. 230, n. 4732, p. 1350-1354, 1985.

SIDDEL, S.; WEGE H.; TER MEULEN, V. The structure and replication of coronaviruses. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, Berlin, v. 99, p. 131-163, 1982.

SILVA, J. M. L. Bronquite infecciosa das galinhas: como e quando introduzir novas vacinas. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 1989, São Paulo. **Anais...** Campinas : FACTA, 1989. p. 145-150.

SMATI, R.; SILIM, A.; GUERTIN, C.; HENRICHON, M.; MARANDI, M.; ARELLA, M.; MERZOUKI, A. Molecular characterization of three new avian infectious bronchitis virus strains isolated in Quebec. **Virus Genes**, New York, v. 25, n. 1, p. 85-93, 2002.

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

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

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

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

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

WANG, C. H; HONG, C. C.; SEAK, J. C. An ELISA for antibodies against infectious bronchitis virus using an S1 spike polypeptide. **Vet. Microbiol.**, Amsterdam , v. 85, n. 4, p. 333-342, 2002.

WETZEL, T.; CANDRESSE, T.; MACQUAIRE, G.; RAVELONANDRO, M.; DUNEZ, J. A highly sensitive immunocapture polymerase chain reaction method for plum pox potyvirus detection. **J. Virol. Methods**, Amsterdam, v. 39, n. 1-2, p. 27-37, 1992

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

YU, C.; WU, J.; ZHOU, X. Detection and subgrouping of Cucumber mosaic virus isolates by TAS-ELISA and immunocapture RT-PCR. **J. Virol. Methods**, Amsterdam, v. 123, n. 2, p. 155-161, 2005.