UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS

CÂMPUS DE JABOTICABAL

IMUNOCAPTURA DO VÍRUS DE INFLUENZA AVIÁRIA PARA DIAGNÓSTICO EM RT-PCR EM TEMPO REAL

Fulvia Di Pillo

Bióloga

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL

Junho de 2010

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS

CÂMPUS DE JABOTICABAL

IMUNOCAPTURA DO VÍRUS DE INFLUENZA AVIÁRIA PARA DIAGNÓSTICO EM RT-PCR EM TEMPO REAL

Fulvia Di Pillo

Orientador: Prof. Dr. Hélio José Montassier

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia Agropecuária.

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL

Junho de 2010

Di Pillo, Fulvia

D596i Imunocaptura do vírus de Influenza aviária para dia diagnóstico em RT-PCR em tempo real. – Jaboticabal, 2010

xx, 54 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2010

Orientador: Hélio José Montassier

Banca examinadora: Liana Brentano e Manoel Victor Franco Lemos

Bibliografia

1. Influenza aviária. 2. Imunocaptura.3. Real Time PCR I.Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 576.8

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

CERTIFICADO APROVAÇÃO

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

FULVIA DI PILLO – Nascida de 31 de outubro de 1980, natural de São Paulo, Estado de São Paulo, é formada em Biologia no ano de 2005, pela Universidade São Francisco – Campus de Bragança Paulista. Atualmente inscrita no Conselho Regional de Biologia de São Paulo sob o no 51483/01-D. Em março de 2001 foi contratada pela Fundação de Desenvolvimento da Pesquisa Agropecuária para trabalhar no Laboratório Nacional Agropecuário (Lanagro-SP) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), na Área de Virologia do Setor de Sanidade Aviária. Em 2006 passou a atuar na Área de Biologia Molecular, do mesmo setor, auxiliando desde o início da implantação dessa área até agosto de 2009. Ainda em agosto de 2009 passou a ser bolsista do projeto CNPq n. 578738/2008-2 com o título "Métodos de Análise Genômica como Ferramentas para o Desenvolvimento e Fiscalização da Pecuária Nacional", sob a coordenação do prof. Dr. José Fernando Garcia, na Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia – Campus de Medicina Veterinária em Araçatuba, SP, onde atua até o momento. Em Março de 2008 iniciou o curso de Pós-Graduação em Microbiologia Agropecuária ao nível de Mestrado na Faculdade de Ciência Agrárias e Veterinárias – Unesp – Câmpus de Jaboticabal.

“Não é o mais forte que sobrevive, nem o mais inteligente, mas o que melhor se adapta às mudanças”

Charles Darwin

“Pedras no caminho? Guardo todas, um dia vou construir um castelo...”

Fernando Pessoa

Dedico

Àos meus amados pais, Lélio (*in* memorian) e Vera, pedras angulares da minha vida e responsáveis pela formação do meu caráter e persistência.

Agradeço a vocês pela minha vida e em especial
a minha mãe pela luta em minha criação
e apoio incondicional.

Ofereço

A Deus que me formou e guiou por toda existência e pela realização deste sonho.

À minha mãe, pelo sacrifício de toda uma vida para me criar e pelo amor e apoio incondicional.

Ao meu irmão, Beto, que sempre foi meu orgulho e exemplo de conduta e dedicação.

Aos meu avós (*in memorian*), tia Iara (*in memorian*) e tio Pérsio, por sempre acreditarem em mim e me apoiarem.

E à Dra Liana, cuja sabedoria me inspirou para entrar neste caminho e que, por mais estúpidas que fossem minhas dúvidas sempre foi paciente e gentil.

Agradecimentos

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal, especialmente ao Departamento de Imunovirologia, pela acolhida.

Ao Prof. Dr. Hélio J. Montassier, a quem muito admiro, pela orientação, disponibilidade, incentivo e por toda a preocupação em me ajudar mesmo sem minha presença integral em seu laboratório.

À Dra. Liana Brentano pela co-orientação extra oficial durante todo o processo e pela apendizagem que me proporcionou.

Ao Laboratório Nacional Agropecuário (Lanagro-SP) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento pela permissão, colaboração e estímulo.

Ao Dr. Abrahão Buchatski e ao André de Oliveira Mendonça pelo apoio e incentivo.

À toda a minha família pelo apoio e compreensão.

Às amigas,Carla e Soraya, que estiveram presentes nos momentos de desânimo, tensão e desespero com total apoio. Obrigada pela amizade e paciência.

À Simone pela amizade e conselhos e cuja admirável persistência e força de vontade para sua formação acadêmica me serviram de exemplo a seguir.

Aos amigos do Setor de Sanidade Avícola do Lanagro-SP pelo companheirismo.

À todos os colaboradores do Lanagro que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, em especial para o pessoal do Setor de Meio de Cultura, que sempre me socorreu na hora do ‘aperto’.

Aos animais utilizados neste experimento que doaram suas vidas em favor da Ciência.

Finalmente, a todos aqueles que de alguma forma contribuíram não somente para a realização deste trabalho, como também para o meu aprimoramento profissional.

SUMÁRIO

Página

Lista de Tabelas.....viii
Lista de Figuras.....x
Lista de Abreviaturas.....xi
Resumo.....xiii
Summary.....xiv
I. INTRODUÇÃO.....1
II. REVISÃO DE LITERATURA 5
2.1. Influenza aviária (IA).....5
2.1.1.Biologia do vírus de Influenza aviária (AIV)..... 5
2.1.2. Vírus de influenza aviária de alta patogênicidade (HPAIV).....6
2.1.3. Características do Vírus de Influenza aviária.....6
2.2. Diagnóstico do AIV.....7
2.3.Imunocaptura (IC).....8
III. OBJETIVOS.....15
IV. MATERIAL E MÉTODOS.....16
4.1 Amostras Virais.....16
4.2. Propagação viral dos subtipos de AIV em ovos embrionados SPF.....16
4.3. Produção do Soro Hiperimune Anti-AIV em Galinhas.....17
4.4 Precipitação da Fração Gama-Globulina.....18
4.5 Preparação das placas de IC.....19
4.6 Extração de RNA com Trizol LS Reagent® (Invitrogen, USA) 20
4.7 Extração de RNA com o kit MagMAX® (Ambion, USA).....20
4.8 Extração de RNA com o equipamento de extração automatizada MagNA Pure LC® (ROCHE, Alemanha).....21
4.9 Oligonucleotídeos Iniciadores utilizados na técnica convencional de RT-PCR.....22
4.10 RT-PCR convencional.....23
4.11 Eletroforese em Gel de Agarose.....24
4.12 RT-PCR em tempo real.....24

4.13 Avaliação da Especificidade Analítica do Método de IC-RT-PCR.....25
4.14 Preparação das Amostras para Avaliação da Sensibilidade Analítica do Método de IC-RT-PCR.....25
V. RESULTADOS.....26
5.1 Padronização do teste de IC.....26
5.2 Determinação da especificidade analítica.....32
5.3 Avaliação da Sensibilidade Analítica.....33
VI. DISCUSSÃO.....38
VII. CONCLUSÃO.....46
VIII. CONSIDERAÇÕES GERAIS.....47
XIX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....48

Lista de Tabelas

Página

Tabela 1. Título viral, obtidos pelo método de hemaglutinação em microplaca e expressos em unidades hemaglutinantes (UHA), dos AIV H2, H3 e H2N2 padrão, após propagação em ovos embrionados SPF. 17

Tabela 2. Sorologia dos **Soros Hiperimune Anti-AIV em Galinhas** pelos métodos de ELISA, Inibição de Hemaglutinação (HI) e Imunodifusão em Ágar Gel (AGP) nas coletas do 15º e 30º dias pós inoculação.....18

Tabela 3. Oligonucleotídeos iniciadores (‘primers’) utilizados na técnica convencional de RT-PCR.....23

Tabela 4. Resultados da RT-PCR em tempo real com os diferentes tipos de tratamentos prévios da amostra de AIV H2N2 padrão nas diluições 10^{-1} a 10^{-3} ..... .28

Tabela 5. Resultados da RT-PCR em tempo real com os diferentes tipos de combinações de soro que foram utilizadas para impregnar a placa de imunocaptura.....29

Tabela 6. Resultados, por RT-PCR em tempo real, da presença de AIV dos subtipos H2, H3 e H4 isolados em placa de Imunocaptura com anticorpos de captura obtidos a partir de AIV H2 e H3 30

Tabela 7. Descrição dos parâmetros testados para a otimização do método de IC-RT-PCR em AIV.....31

Tabela 8. Comparação do IC-RT-PCR convencional com diferentes métodos de extração de RNA em LCA e suabes de traquéia e cloaca de aves SPF, contaminadas AIV H2N2 padrão em diluições seriadas (10^{-2} a 10^{-6}).....34

Tabela 9. Comparação do IC-RT-PCR em tempo real com diferentes métodos de extração de RNA em LCA, suabe de traquéia e suabe de cloaca de aves SPF, contaminadas com o AIV H2N2 padrão em diluições seriadas (10^{-2} a 10^{-6})..... 35

Tabela 10. Limites de detecção de amostras de LCA, suabe de traquéia e suabe de cloaca experimentalmente contaminadas com AIV H2N2 padrão com diferentes métodos de extração de RNA, com posterior análise em RT-PCR em tempo real..... 36

Tabela 11. Vantagens e desvantagens observadas nos métodos de extração de RNA e no método de Imunocaptura.....37

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1. Esquematização do método de Imunocaptura.....19

Figura 2. Representação esquemática resumida do princípio da extração de ácidos nucléicos utilizando o o kit MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation® e processada no equipamento de extração automatizada MagNA Pure LC (Roche, Alemanha).....22

Figura 3. Análise de especificidade do IC-RT-PCR convencional, usando primers MF3/cdc e MR-1/cdc.....32

Figura 4. Avaliação da sensibilidade analítica do IC-RT-PCR convencional em relação a diluições seriadas do AIV H2N2 padrão. O LCA foi submetido a diluições seriadas de razão 10 (10^0 a 10^4).....33

LISTA DE ABREVIATURAS

IC: Imunocaptura

M: proteína matriz

AIV: vírus de Influenza aviária

LCA: líquido cório-alantóide

OIE: Organização Mundial de Saúde Animal

USDA: United States Departamento of Agriculture (Ames, EUA)

PCR: Reação de cadeia de polimerase

RT: Transcrição reversa

IA: Influenza aviária

NP: Nucleoproteína

H: Hemaglutinina

N: Neuraminidase

cDNA: DNA complementar

ELISA: Enzyme Linked Imunossorbent assay

SPF: Specific Pathogen Free

LPAI: Influenza aviária de baixa patogenicidade

HPAI: Influenza aviária de alta patogenicidade

PBS: Solução salina tamponada de fosfato

AGP: Imunodifusão em ágar gel

IPIV: Índice de patogenicidade intravenosa

HI: inibição da hemaglutinação

HA: teste de hemaglutinação em placa

Lanagro: Laboratório Nacional Agropecuário (São Paulo – Brasil)

MAPA: Ministério da Agricultura e Abastecimento (Brasil)

NB-3: Nível de segurança biológica 3

UHA: Unidades hemaglutinantes

BSA: Albumina bovina

DEPC: Dietil piro-carbonato

TA: Temperatura ambiente

NVSL: National Veterinary Services Laboratory – USDA (Ames, EUA)

CDC: Center for Disease Control and Prevention (Atlanta, USA)

bp: Pares de bases

Ct: “Threshould cycle”

DP: Desvio padrão

IgG: Fração imunoglobulina

MP: MagNA Pure LC (ROCHE)

AMB: kit MagMAX (Ambion)

BI: Bronquite infecciosa das aves

IMUNOCAPTURA DO VÍRUS DE INFLUENZA AVIÁRIA PARA DIAGNÓSTICO EM RT-PCR EM TEMPO REAL

RESUMO: A técnica de imunocaptura associada com a reação de transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase (IC-RT-PCR) executadas tanto pelos procedimentos convencional como em tempo real foram testadas para a detecção rápida do gene da glicoproteína de Matriz (M) do vírus de influenza aviária (AIV) em amostras de líquido cório-alantóide (LCA) e em suabes traqueais e cloacais. O presente trabalho teve como objetivo desenvolver e otimizar a técnica de IC-RT-PCR para o diagnóstico do vírus da Influenza aviária. Os resultados obtidos foram comparados com um sistema empregando “beads” magnéticas em microplacas (AMBION), que é o método padrão de extração de RNA usado no laboratório de referência para diagnóstico de influenza aviária, o National Veterinary Services Laboratory – Ames, EUA (USDA), acrescido ainda de outros métodos de extração tradicionalmente usados nos laboratórios de referência para AIV, como os procedimentos com o uso do solvente orgânico Trizol® (Invitrogen) e com um sistema robotizado e que utiliza “beads” magnéticas (MagNA Pure - ROCHE). A técnica de IC-RT-PCR em tempo real neste estudo detectou a estirpe H2N2 do AIV, sem que nenhum outro dos RNA-vírus heterólogos testados fossem detectados (vírus das doença de Gumboro, de Newcastle e da bronquite infecciosa aviária). Os limites de detecção do IC-RT-PCR foram iguais aos obtidos na técnica de extração com o kit da AMBION e menores do que aqueles que foram observados para os métodos de extração com Trizol® (Invitrogen) e com o MagNA Pure. O IC-RT-PCR demonstrou ser um sistema de diagnóstico capaz de conciliar simplicidade operacional e um menor custo com sensibilidade e especificidade analíticas iguais às do procedimento padrão atualmente adotado, podendo ser inclusive por laboratórios dotados de uma infra-estrutura mais simples.

Palavras-Chave: imunocaptura em microplaca, PCR em tempo real, vírus influenza aviária

RNA EXTRACTION BY IMMUNOCAPTURE FOR AVIAN INFLUENZA VIRUS DETECTION WITH REAL-TIME RT-POLYMERASE_CHAIN REACTION

SUMMARY: The polymerase chain reaction (PCR) and reverse transcription-PCR (RT-PCR), including real-time RT-PCR have been used for the rapid detection of Matrix glycoprotein gene (M gene) Avian influenza virus (AIV). Despite the availability of various RNA extraction methods for using in RT-PCR, isolation and detection of viral RNA are still difficult due to the unstable nature of viral RNA molecules and the presence of PCR inhibitory substances. In this study, a simple method using immune-capture (IC) to recover viral RNA from H2 AIV samples was developed and compared to one standard and two others reference methods used for viral RNA extraction, such as Ambion MagMAX™ kit and Trizol® (Invitrogen) and Magnapure kit (Roche), respectively, with subsequent analysis by real-time RT-PCR. The real-time IC-RT-PCR developed in was able to detect specifically H2N2 AIV strain, without detecting non-related avian RNA-virus pathogens, such as Newcastle disease virus, avian infectious bronchitis virus and Gumboro disease virus. Comparable detection limits were found for IC and the standard RNA extraction method using Ambion MagMAX™ kit, either for the detection of AIV in allantoic fluid suspension or in seeded tracheal and cloacal swab samples by conventional or real time RT-PCR techniques. These methods were less sensitive than Trizol® (Invitrogen) and Magnapure kit (Roche) procedures. Thus, IC was rapid and as sensitive and specific as current standard AIV RNA extraction method for real time or conventional RT-PCR, besides it conciliated simplicity and lower cost and can be applied simultaneously for direct detection of AIV in a large number of samples, including less-equipped laboratories.

Key-Words: avian influenza virus, microplate immunocapture, real time RT-PCR

I. INTRODUÇÃO

A infecção pelo vírus de Influenza aviária (AIV) acomete aves aquáticas de forma assintomática e em aves domésticas causa uma doença infecciosa de disseminação muito rápida por via aerógena e caracterizada pelo desenvolvimento de lesões e sinais clínicos no trato respiratório, sistema nervoso, trato genital, levando à queda na produção de ovos e, ainda, a uma alta mortalidade, o que acarreta enorme prejuízo econômico para a avicultura comercial. Isso tudo faz com que a Influenza aviária (IA) seja considerada pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), como de notificação obrigatória, impondo rigorosas barreiras sanitárias à comercialização de produtos avícolas nos mercado internos e internacional. Além disso, essa doença é classificada como zoonose, pois foi demonstrado que, alguns subtipos virais têm implicação direta em saúde humana, podendo ser transmitidos diretamente de galinhas para os seres humanos, representando, portanto preocupação permanente aos agentes de saúde pública.

Os vírus de Influenza aviária são classificados no gênero *Influenzavírus*, da família Orthomyxoviridae e se dividem em três diferentes grupos: A, B e C, de acordo com características antigênicas de duas principais proteínas internas: a nucleoproteína (NP) e a proteína da matriz (M). Os vírus do grupo A infectam diferentes espécies; aves, humanos, suínos, equinos e mamíferos marinhos (WEBSTER et al., 1992). Sua estrutura apresenta um envelope composto por glicoproteínas, um nucleocapsídeo de simetria helicoidal e um genoma viral formado por oito diferentes segmentos de RNA que codificam 10 proteínas virais (SWAYNE et al., 2003).

O diagnóstico rápido do vírus da influenza aviária durante um surto da infecção por esse vírus é de suma importância para a adoção de um programa de controle mais eficiente. Qualquer demora maior na detecção e identificação do AIV tem como consequência uma disseminação mais rápida e por maiores distâncias

desse vírus, tornando cada vez mais difícil se fazer o controle e a erradicação desse agente infeccioso (PELZEL et al., 2006). Existe uma gama de diferentes meios para se fazer o diagnóstico laboratorial da influenza aviária, compreendendo os métodos indiretos, representados pelos testes sorológicos e os métodos diretos de detecção do agente infeccioso. Os procedimentos mais comumente usados para o diagnóstico do AIV são o isolamento viral em ovos embrionados livres de patógenos específicos (SPF), a imuno detecção de antígenos virais e os procedimentos de biologia molecular, como a RT-PCR e seqüenciamento, para a detecção e genotipagem viral. (SWAYNE et al., 2000; RUEST et al., 2003).

As técnicas de diagnóstico molecular da IA visam em essência fazer a amplificação de uma dada região de um dos genes do AIV, sendo mais comumente usados como alvos os genes da proteína M, NP e hemaglutinina (H) (SPACKMAN et al., 2002). Dentre as técnicas moleculares usualmente empregadas no diagnóstico laboratorial do AIV destacam-se as reações de transcrição reversa e em cadeia da polimerase (RT-PCR) convencional, o método de RT-PCR-ELISA e a técnica de RT-PCR em tempo real (SUAREZ et al., 2007).

Um dos objetivos da aplicação das técnicas de biologia molecular aplicadas no diagnóstico laboratorial do AIV é conferir maior rapidez e sensibilidade comparável à técnica de isolamento viral, mantendo, ainda, um alto nível de especificidade na obtenção de resultados. Para alcançar tais propósitos, três pontos críticos devem ser observados, tais como a etapa de extração do RNA viral, a etapa de amplificação por RT-PCR e a composição de nucleotídeos dos '*primers*' e, quando for o caso, da oligo-sonda. Todos esses três fatores são críticos para a sensibilidade e especificidade das técnicas de diagnóstico molecular do AIV (SUAREZ et al., 2007).

A detecção do AIV, tanto para o diagnóstico de casos suspeitos quanto para a monitoria de propriedades produtoras e aves silvestres, é realizada a partir da coleta de suabes cloacais e traqueais. Principalmente no caso dos suabes cloacais, há uma grande presença de substâncias inibitórias da PCR, especialmente da enzima Tac DNA polimerase, de tal forma que vários métodos

têm sido utilizados para a remoção destes interferentes de amostras clínicas e para conferir um incremento da sensibilidade dessa mesma técnica (GILPATRICK et al., 2000).

Dessa forma ficou evidenciado que a extração de RNA genômico viral é um passo crítico para a obtenção de melhores resultados nas técnicas de biologia molecular, uma vez que a qualidade do RNA interfere diretamente na eficiência de amplificação da RT-PCR. Nesse sentido, verifica-se que estão disponíveis vários métodos de extração de RNA, incluindo extração por solventes orgânicos como as misturas composta por fenol e isotiocianato de guanidina, a extração por colunas de sílica e a extração por *'beads'* magnéticas. Cada um desses métodos têm vantagens e desvantagens, apresentando desempenhos melhores ou piores, na dependência do tipo de amostras para diagnóstico. Por exemplo, amostras com menor celularidade e mais límpidas, como os suabes laringo-traqueais, tendem a proporcionar melhores resultados quando submetidas à extração por colunas de sílica ou por *'beads'* magnéticas, enquanto que para amostras com maior quantidade de matéria orgânica, como os suabes cloacais e fragmentos de órgãos, a extração com fenol – isotiocianato de guanidina proporciona uma maior recuperação de RNA genômico viral com menor quantidade de inibidores da PCR e, por conseguinte, confere uma maior sensibilidade na amplificação de produtos gênicos específicos do AIV (SUAREZ et al., 2007). A desvantagem desse último método, entretanto, é que ele requer muito mais fases de manipulação, sendo muito difícil se fazer uma semi-automatização ou automatização completa. Situação oposta ocorre com as técnicas de colunas de sílica ou de *'beads'* magnéticas, que podem ser mais facilmente redimensionadas para uma escala maior e, inclusive, para serem automatizadas e realizadas por robôs.

O método de imunocaptura (IC) associado à técnica de RT-PCR (IC-RT-PCR) visa à simplificação e redução de tempo de preparo de amostras para um diagnóstico do vírus de Influenza mais rápido e para possibilitar a manipulação de um maior número de amostras, sem perda da sensibilidade e especificidade na detecção deste vírus. Esse método de IC-RT-PCR é baseado na amplificação de um DNA complementar (cDNA) sintetizado a partir do RNA derivado de partículas

virais previamente capturadas em um suporte sólido, como as paredes das cavidades de uma microplaca de ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay). Esta técnica já foi utilizada com sucesso para a detecção de RNA-vírus patogênicos para o ser humano, animais e plantas. Além disso, essa técnica torna a preparação de amostras biológicas mais simples, pois utiliza menos etapas para a obtenção do RNA viral molde para a RT-PCR, não requer o uso de solventes orgânicos de difícil descarte, nem de resinas ou *'beads'* de custo mais elevado para a adsorção específica de RNA (GALL-RECULÉ et al., 2001; LUNELLO et al., 2004; MONTASSIER et al., 2006; KOGOVSEK et al., 2008; PIZA, 2008).

O presente estudo objetivou desenvolver e otimizar o método de IC-RT-PCR em tempo real para a detecção do vírus de Influenza Aviária em líquido cório-alantóide (LCA) e em amostras de suabes cloacais e traqueais de aves SPF, contaminados experimentalmente com o AIV e comparar com os resultados obtidos com metodologias de referência ou preconizadas pelos laboratórios oficiais de diagnóstico molecular desse vírus para a extração de RNA viral.

II. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Influenza aviária (IA)

A Influenza aviária é uma doença viral que acomete tanto aves domésticas, como silvestres. Pode-se manifestar de forma branda ou ser assintomática, sendo conhecida neste caso como Influenza aviária de baixa patogenicidade (LPAI) ou na forma mais grave e que é classificada como Influenza aviária altamente patogênica (HPAI). O tipo de patogenicidade depende de fatores como: a cepa do vírus, a espécie e idade do hospedeiro, o estado de imunidade do hospedeiro, a presença de outros agentes infecciosos (por exemplo: vírus de Newcastle, vírus de Bronquite, Pneumovirus ou Micoplasma) e condições ambientais desfavoráveis, como por exemplo ambiente com excesso de amônia e/ou sujeira e temperaturas muito elevadas ou muito baixas (AAMIR et al, 2007; ALEXANDER, 2008). Os isolados de subtipos de alta patogenicidade foram obtidos primariamente de galinhas e perus, porém considera-se que todas as espécies de aves sejam susceptíveis à infecção. Dentre os 16 tipos de hemaglutinina descritas para os diferentes subtipos do AIV, duas (H5 e H7) estão associadas com patótipos potencialmente de maior virulência para aves domésticas (WIDJAJA et al, 2004; SPACKMAN, 2008). Os sinais clínicos que caracterizam a Influenza aviária são problemas respiratórios, nervosos, queda na produção de ovos, sendo que nos casos de alta patogenicidade estes sinais são mais graves e há ainda alta mortalidade das aves, a qual pode chegar a 100% dentro de 48 horas (BERCHIERI, 2000; LAU et al, 2004; AAMIR et al, 2007; ALEXANDER, 2008; OIE, 2009). A ocorrência de Influenza aviária, principalmente na forma altamente patogênica, certamente acarreta em enorme prejuízo econômico para a avicultura comercial.

2.1.1 Biologia do vírus de Influenza aviária (AIV)

As espécies hospedeiras naturais do AIV são as aves selvagens, principalmente as aquáticas. Nestas espécies o vírus não provoca nenhum sintoma ou dano visível, tornando difícil sua detecção. A maioria dos AIV tem sua replicação primária no epitélio do trato intestinal e amostras de fezes podem conter altos títulos virais, o que sugere que o mecanismo de disseminação do vírus entre aves se dá pela transmissão via fecal-oral ou por contaminação da água com fezes (WEBSTER et al, 1992). Além do risco de introdução do vírus pelo contato com aves migratórias, outras formas devem ser consideradas, incluindo especialmente, os riscos decorrentes da movimentação de aves, criações de múltiplas espécies e contato com lagos e rios onde aves aquáticas migratórias se estabelecem (SPACKMAN, 2008).

Em poucas ocasiões os vírus têm sido transmitidos a espécies hospedeiras não naturais, incluindo outras espécies de aves e numerosas espécies de mamíferos (WIDJAJA et al, 2004; KUMAR et al, 2006; LEBARBENCHON et al, 2007; SPACKMAN et al 2008,). Quando esta transmissão ocorre pode haver adaptação e estabilização do vírus na nova espécie hospedeira, como por exemplo no caso do H1N1 em suínos e H3N8 em eqüinos (LEBARBENCHON et al, 2007).

2.1.2 Vírus de influenza aviária de alta patogênicidade (HPAIV)

A HPAI foi reconhecida como uma doença viral grave de aves domésticas desde 1878 (MUKHTAR et al, 2007). A partir da década de 1990, cientistas observaram episódios de infecção pelo vírus de influenza dos subtipos H5, H7 e H9 que atravessaram a barreira interespecífica causando infecção em seres humanos.(STEPHENSON et al, 2004; HORIMOTO e KAWAOKA et al, 2005; YU et al, 2005).

O primeiro caso de infecção de vírus de influenza aviária altamente patogênico em humanos relatado foi o surto de H5N1 em Hong Kong, China em

1997, que se iniciou com 18 pessoas infectadas e 6 óbitos (KUMAR et al, 2006; MUKHTAR et al, 2007; BRAGSTAD et al, 2007; DUAN et al, 2007; CATTOLI e TERREGINO, 2008; OIE, 2009; WHO, 2010). Antes do surto em humanos em 1997 o HPAIV H5N1 em aves tinha circulado em uma região mais restrita da China e persistia em gansos e patos.(BRAGSTAD et al, 2007)

Alguns pesquisadores acreditam que a adaptação do subtipo H5N1 em humanos pode ter sido gerado por um rearranjo múltiplo entre o genoma de uma estirpe de H5 e as estirpes H9N2 ou H6N1, encontradas em aves comerciais e domésticas (GUAN et al, 1999; HOFFMANN et al, 2000; DUAN et al, 2007; MUKHTAR et al, 2007) e devido a preferência da glicoproteína hemaglutinina de se associar fortemente no epitélio do trato respiratório superior humano (CHANDRASEKARAN et al, 2008).

No período de 2003 a junho de 2010, 63 países notificaram a presença do AIV H5N1 em aves, sendo os focos relatados mais recentemente em Bangladesh, Índia, Myanmar, Nepal e na Indonésia (OIE, 2009; WHO, 2010). Em humanos, foram registrados 489 casos confirmados laboratorialmente e 289 mortes desde o primeiro caso relatado até março de 2010, sendo que neste ano, até momento, foram relatados 21 casos dentre os quais sete mortos, distribuídos no Egito, Indonésia e Vietnã (WHO, 2010).

Devido a estes casos de infecção em humanos a Influenza aviária é considerada uma zoonose e é classificada como uma das doenças da lista A da OIE, sendo portanto, de notificação obrigatória, o que impõe o estabelcimento de barreira sanitária à comercialização de produtos avícolas no mercado interno e internacional (CATTOLI e TERREGINO, 2008; OIE,2009; MAPA, 2009).

2.1.3 Características do Vírus de Influenza aviária

Os vírus de Influenza são membros do gênero *Influenzavírus*, família Orthomyxoviridae e se dividem em três diferentes grupos: A, B e C, de acordo com características de duas principais proteínas internas, a nucleoproteína (NP) e a proteína da matriz (M). Os grupos B e C dos vírus de Influenza são considerados

importantes para humanos, já os vírus de Influenza do grupo A infectam diferentes espécies; com destaque para as aves, humanos, suínos, eqüinos e mamíferos marinhos (WEBSTER et al., 1992). De qualquer forma, somente o AIV do tipo A tem sido responsável por todas as pandemias humanas de influenza (TIMOTHY et al. 2007).

O genoma do Influenza tipo A é constituído por fita simples de RNA com sentido negativo e é separado em 8 segmentos que codificam 10 ou 11 proteínas virais, dependendo do isolado (WEBSTER et al, 1992; TIMOTHY et al, 2007; BELSER et al, 2009). É um vírus envelopado e pleomórfico, com tamanho variando de 80 a 120 nm (WEBSTER et al, 1992; HARRIS et al, 2006; TIMOTHY et al, 2007). Dois tipos de glicoproteínas estão ancoradas na membrana bilipídica do envelope viral: a hemaglutinina (H) e a neuraminidase (N). Com base na caracterização destas glicoproteínas é que a variação antigênica do vírus é classificada. Existem 16 subtipos conhecidos de H (de H1 a H16) e 9 subtipos conhecidos de N (numerados de N1 a N9) (WEBSTER et al, 1992; HARRIS et al, 2006; TIMOTHY et al, 2007 BELSER et al, 2009).

O período de incubação do vírus Influenza pode variar de 24 horas a três dias, quando se inicia o pico de excreção viral e sua disseminação respiratória-oral-fecal, persistindo, em média, por 10 dias ou mais em aves domésticas. O período agudo da doença, quando ocorre a excreção viral, é o momento ideal para coleta de amostras. Em aves silvestres, a excreção viral foi detectada por mais de 30 dias após a infecção, e as aves parecem sofrer ciclos periódicos de reinfecção por diferentes subtipos de vírus, carreando o vírus de forma assintomática por longos períodos (EASTERDAY et al., 1997).

2.2 Diagnóstico do AIV

Nos casos de surtos de Influenza aviária de alta patogenicidade, o diagnóstico presuntivo se inicia com um histórico de sinais clínicos e lesões de doença respiratória, hemorragias na crista e barbela, sinais nervosos, diarréia e alta mortalidade. As lesões e o curso da doença com estas características,

principalmente a alta mortalidade das aves, são sugestivos de Influenza aviária e devem ser considerados alerta para tomada imediata de medidas para o diagnóstico (BERCHIERI, 2000; SPACKMAN, 2002; AAMIR et al, 2007; ALEXANDER, 2008; MAPA, 2009). Nos surtos de doença com vírus de baixa patogenicidade, muitos destes sinais estão ausentes ou presentes de forma mais branda. A mortalidade das aves pode ser baixa e, nestes casos, a doença pode ser confundida com outras doenças respiratórias de aves (Berchieri, 2000; SPACKMAN, 2004; AAMIR et al, 2007; ALEXANDER, 2008; MAPA, 2009).

No Brasil, a detecção de anticorpos contra o vírus Influenza no soro de galinhas é utilizada para a monitoria de plantéis, permitindo um rápido diagnóstico presuntivo de Influenza. A coleta de material para isolamento viral deve necessariamente ser realizada para o diagnóstico definitivo, e a partir daí o subtipo do vírus assim como sua caracterização quanto à patogenicidade poderá ser determinada (MAPA, 2001; MAPA, 2009).

No caso de suspeita de infecção por influenza aviária a confirmação do diagnóstico deve necessariamente ser laboratorial. Os espécimes clínicos incluem amostras de aves mortas e vivas. As amostras das aves mortas devem incluir conteúdo intestinal (fezes), suabes oro-nasal, amostras de traqueia, pulmões, sacos de ar, intestino, baço, rins, cérebro, fígado e coração. As amostras de aves vivas devem incluir tanto suabes de traquéia quanto de cloaca, embora a coleta de fezes frescas, também pode servir como uma alternativa. As amostras devem ser posteriormente colocadas em solução salina isotónica tamponada de fosfato (PBS), contendo uma mistura de antibióticos, a fim de eliminar todas as bactérias ou outros agentes que possam interferir nos processos subsequentes de diagnóstico. Embora as amostras destinadas ao diagnóstico possam ser temporariamente armazenadas a 4 ℃, é recomendado que sejam mantidas a -80 ℃, especialmente para o armazenamento prolongado (ALEXANDER, 2008; CATTOLI e TERREGINO, 2008; MAPA, 2009; OIE, 2009).

A técnica padrão, aceita pela OIE, para o diagnóstico de vírus de Influenza aviária e da avaliação em amostras clínicas é o isolamento em ovos embrionados SPF. Nesse método a replicação desse vírus requer a inoculação do patógeno em

ovos embrionados SPF com 9 a 11 dias por um período de incubação de 4 a 7 dias a 35-37 ℃ (ALEXANDER, 2008; CATTOLI e TERREG INO, 2008; MAPA, 2009; OIE, 2009).

Em seguida, o líquido alantóico (LA) é testado pela técnica de hemaglutinação (HA) de hemácias de galinha, a qual em caso positivo indica alta probabilidade da presença de vírus de influenza ou de um Paramyxovirus aviário (ALEXANDER, 2008; MAPA, 2009; OIE,2009).

A presença do vírus influenza A no LA pode ser confirmada através do teste de imunodifusão em gel de Agar (AGP) onde a presença dos antígenos do nucleocapsídeo ou matriz pode ser demonstrada com o uso de soros hiperimunes anti-VAI (ALEXANDER, 2008; MAPA, 2009; OIE, 2009).

Outra técnica de aplicação, é o teste de ELISA, que detecta a presença de anticorpos, sendo que vários kits comerciais de ELISA estão disponíveis para esta finalidade (ALEXANDER, 2008; CATTOLI e TERREGINO, 2008; MAPA, 2009; OIE, 2009).

Os testes de Inibição da hemaglutinação (HI) são também utilizados para a detecção e identificação antigênica do VAI em LA, permitindo que sejam diferenciados em 16 subtipos de HA do VAI (ALEXANDER, 2008; MAPA, 2009; OIE, 2009).

Uma vez que o agente infeccioso foi identificado como um vírus de influenza aviária a avaliação da patogenicidade é o próximo passo. O método atualmente utilizado para a determinação da patogenicidade dos isolados inclui a inoculação intravenosa do líquido cório-alantóide (LCA) proveniente do isolamento viral em ovos SPF em 10 frangos com 4 a 8 semanas de idade. Se houver uma mortalidade de mais de 75% ou o índice de patogenicidade intravenosa (IPI) for superior a 1,2 dentro de 8-10 dias é considerado de alta patogenicidade (ALEXANDER, 2008; MAPA, 2009; OIE, 2009).

Quanto aos métodos indiretos de diagnóstico da IA, destacam-se os testes de HI, de AGP e o ELISA. Os testes sorológicos de AGP e ELISA são realizados com antígeno viral inativado e não oferecem risco biológico, permitindo a execução em laboratórios de menor nível de biossegurança (MAPA, 2001; OIE,

2009), entretanto, os antígenos para sorologia são importados o que torna o processo ainda mais oneroso. Quanto ao desempenho como meio de diagnóstico da IA, o teste de HI apresenta excelente especificidade e boa sensibilidade, porém exige muito tempo para sua realização. Já, o teste de AGP detecta anticorpos contra nucleoproteínas e proteínas de matriz, mas apresenta baixa sensibilidade e elevada especificidade, além do fato que a aplicação de métodos sorológicos geram informações de uso muito limitado (CATTOLI e TERREGINO, 2008; SPACKMAN, 2008). Ainda, certas espécies de aves, principalmente os patos, podem não produzir anticorpos precipitantes, levando a obtenção de resultados falso-negativos na técnica de agar gel precipitação. Foi também demonstrado na avaliação de diferentes métodos sorológicos no diagnósticos de Infuenza aviária, que há uma grande grande variabilidade individual na resposta imune humoral, acarretando diferenças acentuadas no momento da soroconversão e, portanto na detecção de anticorpos entre os testes de HI, AGP e ELISA (LIN et al, 1998), o que traz restrições a aplicação apenas dessa ferramenta isoladamente de diagnóstico.

O isolamento viral é feito em ovos embrionados de galinhas SPF de nove a 11 dias de incubação, podendo necessitar de, pelo menos, três passagens sucessivas, levando cerca de duas a três semanas para confirmação do diagnóstico positivo definitivo ou negativo (ALEXANDER, 2008; CATTOLI e TERREGINO, 2008; SPACKMAN, 2008; MAPA, 2009; OIE, 2009).

No caso de suspeita de Influenza, além do isolamento viral e determinação do subtipo do vírus de Influenza por teste de HI e teste de neuraminidase, devem ser realizados testes para determinação do nível de patogenicidade do vírus isolado. O teste é realizado pela inoculação do vírus em aves e, posterior, avaliação da taxa de mortalidade e lesões, requerendo infra-estrutura de alto nível de biossegurança para o controle de escape e disseminação do vírus (MAPA, 2009; OIE, 2009). A presença de aminoácidos básicos nos sítios de clivagem da HA é característica de vírus altamente patogênicos de Influenza aviaria e, é oficialmente reconhecido pela OIE, a análise por RT-PCR seguida do seqüenciamento do gene HA para diagnóstico e caracterização de cepas

patogênicas e não patogênicas dos vírus de Influenza aviária (ALEXANDER, 2008; BELSER et al, 2009; MUKHTAR et al, 2007; OIE, 2009). Esta ferramenta pode ser utilizada como alternativa aos testes de isolamento, tipificação sorológica e testes de patogenicidade em galinhas. Portanto, testes moleculares tais como RT-PCR em tempo real e RT-PCR associado ao sequênciamento de DNA se constituem em procedimentos mais vantajosos de diagnóstico da IA que vêm sendo cada vez mais utilizados no diagnóstico e nas investigações epidemiológicas de Influenza aviária (SPACKMAN et al, 2002; ALEXANDER, 2008; CATTOLI e FERREGINO, 2008; SPACKMAN, 2008).

O RT-PCR em tempo real vem tomando espaço na área de diagnóstico pela maior velocidade e especificidade de resultados. O teste foi relatado com excelentes resultados para o diagnóstico e determinação de subtipos de vírus de Influenza aviária (SPACKMAN et al, 2002; LAU et al, 2004). A OIE, Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) e a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomendam a utilização de RT-PCR e RT-PCR em tempo real para o diagnóstico de Influenza H5 aviário, devido ao seu alto risco a aves e a humanos.

2.3 Imunocaptura

O método de IC-RT-PCR 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. Esta técnica já foi utilizada com sucesso para a detecção de RNA-vírus patogênicos para o ser humano, animais e plantas. Esta técnica torna a preparação de amostras biológicas mais simples pois utiliza menos etapas para a obtenção do RNA viral molde para ser processado na técnica de RT-PCR (JANSEN et al, 1990; WETZEL et al, 1992; GRAFF et al, 1993; NOLASCO et al, 1993; GALL RECULÉ et al., 2001; YU et al., 2005).

O método de imunocaptura RT-PCR foi inicialmente utilizado por JANSEN et al. (1990) para detecção do Vírus da Hepatite A em espécimes fecais obtidos de

macacos e infectados pelos vírus da hepatite A; tendo sido obtidos bons resultados, os quais conferiram a esta metodologia um elevado potencial para ser empregada no diagnóstico laboratorial do vírus da hepatite A devido à redução do número de passos quando comparada com a técnica convencional de RT- PCR.

Em 1992, a técnica de imunocaptura foi utilizada para detecção de um vírus fito-patogênico que causa lesões severas em ameixeiras, tendo sido demonstrado uma alta sensibilidade e mostrando claramente a sua superioridade para a detecção de baixas concentrações deste vírus presentes em amostra teciduais de plantas infectadas, quando comparada com o diagnóstico realizado pelo teste ELISA (WETZEL et al.,1992).

A utilização da imunocaptura associada com RT-PCR para a detecção do vírus de hepatite A foi novamente utilizada por GRAFF et al, (1993), porém em lodo de esgoto em diferentes pontos da Alemanha. Os resultados obtidos foram superiores à detecção com infecção em cultivos de células e com a vantagem de ser mais rápido, demorando apenas dois dias, enquanto com o método tradicional de isolamento viral em cultivo celular, seriam necessárias oito a dez semanas para o diagnóstico.

NOLASCO et al. (1993) fizeram algumas modificações na reação de imunocaptura e adaptaram o método em microplacas de poliestireno; semelhantes às microplacas utilizadas em ELISA, ao invés de tubos de polipropileno, que eram inicialmente usados, para a detecção de patógenos virais de plantas. Os resultados também foram superiores na detecção desse fitopatógeno, quando são levados em comparação os resultados da técnica de ELISA empregada para esta mesma finalidade.

Em 2001, está 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, qando 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-RECULÉ et al., 2001).

Em adição a isso, esta metodologia de imunocaptura vem sendo empregada com sucesso para outras famílias de RNA vírus (MUNFORD e SEAL, 1997; JACOBI et al, 1998; HEMA et al, 2003; YU et al, 2005; MONTASSIER et al., 2006), 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 RECULÉ et al., 2001; YU et al., 2005).

Em suma, pode-se considerar que o método de imunocaptura (IC) associado à técnica de RT-PCR (IC-RT-PCR) visa a simplificação e redução de tempo de preparo de amostras para um diagnóstico do vírus de Influenza mais rápido e para possibilitar a manipulação de um maior número de amostras, sem perda da sensibilidade e especificidade na detecção deste vírus.

III. OBJETIVOS

Desenvolver e aplicar os métodos de IC-RT-PCR convencional e em tempo real para detecção de AIV (vírus de influenza aviária) em amostras de líquido cório-alantóide (LCA) coletado de ovos embrionados SPF e de suabes cloacais e traqueais de galinhas SPF, contaminados experimentalmente com a estirpe H2N2 padrão do AIV.

Determinar a sensibilidade e especificidade analítica de cada uma das técnicas de biologia molecular desenvolvidas neste estudo.

Comparar os resultados obtidos a partir do método de imunocaptura com os obtidos nos métodos já padronizados de extração de RNA do AIV para a detecção desse mesmo vírus nas técnicas RT-PCR convencional e em tempo real.

IV. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Amostras Virais

Foram usados, para a produção de anticorpos de captura, isolados de campo do vírus AIV obtidos junto ao LANAGRO/SP, dos subtipos H2, H3 e H4 provenientes de isolamentos de aves silvestres. Para os testes de sensibilidade foi utilizada uma amostra de H2N2 de vírus padrão (AIV H2N2 padrão), obtido junto ao laboratório de referência da OIE para diagnóstico de influenza aviaria, o National Veterinary Services Laboratory – Ames, EUA (USDA). Todos os procedimentos com o vírus vivo de influenza foram executados no Laboratório de Biossegurança Nível 3 (NB-3) do Lanagro/SP localizado em Campinas/SP.

4.2 Propagação viral dos subtipos de AIV em ovos embrionados SPF

A propagação viral foi realizada com a metodologia descrita por OWEN et al. (1991) com algumas modificações. Cada amostra viral foi inoculada na cavidade cório-alantóide de ovos embrionados SPF com 9 a 11 dias de incubação e foram realizadas várias passagens.

Em cada passagem foram utilizados 30 ovos por amostra e três ovos para controle negativo (sem qualquer inoculação). A via de inoculação foi a da cavidade cório-alantóide, com administração de 200µL por ovo. Os ovos permaneceram incubados por 72 horas, sendo monitorada sua viabilidade diariamente por ovoscopia. Os embriões mortos em 24 horas de incubação foram descartados por tratar de morte inespecífica. Os demais ovos, com ou sem morte do embrião, ao final das 72 horas de incubação foram sacrificados por choque térmico, com resfriamento a 4ºC por no mínimo 4 horas. A seguir a presença de vírus, em cada

ovo, foi verificada pelo teste de hemaglutinação rápida em placa e apenas dos ovos positivos foram coletados o líquido cório-alantóide (LCA).

Os vírus propagados, dos subtipos H2, H3 e H4 provenientes de isolamentos de aves silvestres e o AIV H2N2 estirpe padrão, foram submetidos a confirmação da presença do AIV por RT-PCR em tempo real e titulados segundo a metodologia de hemaglutinação em microplaca conforme descrito na **Tabela 1**.

Tabela 1. Título viral, obtidos pelo método de hemaglutinação em microplaca e expressos em unidades hemaglutinantes (UHA), dos AIV H2, H3 e H2N2 padrão, após propagação em ovos embrionados SPF.

	AIV **H2**	AIV **H3**	AIV **H4**	AIV **H2N2 padrão**
UHA	512	128	64	1024

4.3 Produção do Soro Hiperimune Anti- AIV em Galinhas

Foram separados 2 grupos contendo 8 aves SPF da linhagem Leghorn Branca em dois diferentes isoladores com pressão positiva e com fornecimento de ar purificado por filtração absoluta, para serem inoculadas separadamente com as estirpes do AIV H2 e H3 (amostras isoladas de campo obtidas junto ao Lanagro/SP). As aves foram infectadas com 1mL de vírus, com título aproximado de 512 e 128 unidades hemaglutinante (UHA) por ave, nas vias ocular, nasal e oral. Houve uma re-infecção, com os mesmos critérios, após 15 dias da primeira inoculação. Amostras de soro foram colhidas ao 15º dia após a primeira inoculação para serem determinados os título de anticorpos pelo método indireto de ELISA e ao 30º dia foram realizados, além do ELISA, os testes de Inibição de Hemaglutinação (HI) e imunodifusão em ágar gel (AGP) cujos resultados encontram-se na **Tabela 2**.

Tabela 2. Sorologia dos **Soros Hiperimune Anti-AIV em Galinhas** pelos métodos de ELISA, Inibição de Hemaglutinação (HI) e Imunodifusão em Ágar Gel (AGP) nas coletas do 15º e 30º dias pós inoculação.

	ELISA [a] (S/P)		**HI** (UHA)		**AGP** [b]	
	Soro anti-H2	**Soro anti-H3**	**Soro anti-H2**	**Soro anti-H3**	**Soro anti-H2**	**Soro anti-H3**
15º dia	1,94	1,53	--	--	--	--
30º dia	5,40	3,87	128	64	1:32	1:16

[a] Teste de ELISA realizado com o kit: IDEXX FlockChek Avian Influenza Antibody Test Kit (IDDEX, USA)
[b] Valores apresentados referem-se a última diluição, a partir do soro bruto, com detecção de anticorpo

4.4 Precipitação da Fração Gama-Globulina

O protocolo de AKITA e NAKAI (1993) foi utilizado para a precipitação da fração gama-globulina. Foram adicionados 200mL de tampão PBS a 200mL de soro anti AIV H3. Em seguida, sob agitação, 267mL de sulfato de amônio 100% foram acrescentados, gota a gota. O volume total foi centrifugado a 3000rpm por 15 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado por duas vezes com solução de sulfato de amônio a 42% de saturação. Após a lavagem o precipitado foi ressuspenso em 1mL de PBS e foi dialisado contra solução salina por 2 dias a 4ºC, com duas trocas de líquido de diálise ao dia.

4.5 Preparação das placas de Imunocaptura (IC)

O método otimizado está descrito a seguir. Adicionou-se, em microplacas de poliestireno (Costar, Corning, USA), 200 µL da solução de anticorpo de captura constituída por um 'pool' de antissoros de galinhas hiperimunizadas com as estirpes H2 ou H3 do AIV, na diluição 1:200, preparadas em tampão carbonato-bicarbonato 0,05M pH 9,6. A reação de adsorção ocorreu por 2 horas a 37ºC em câmara úmida. Ao final dessa etapa, as cavidades da microplaca foram submetidas a três lavagens com solução salina tamponada com fosfato pH 7,4 contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-Tween). Em seguida o bloqueio da superfície das cavidades da microplacas foi realizado pela adição de 200 µl de solução de albumina bovina a 1% (BSA) diluída em PBS-Tween, com incubação de uma hora a 37ºC em câmara úmida. A microplaca foi lavada cinco vezes com PBS-Tween. Na etapa seguinte, 100 µl da suspensão da amostra do AIV (diluída 1:2 em PBS-Tween) foram adicionados à microplaca e a reação foi incubada "overnight" a 4ºC em câmara úmida. As cavidades foram lavadas 3 vezes com PBS-Tween e 1 vez com água destilada estéril. Ao final deste processo foram acrescentados às cavidades 50µl de água ultra pura tratada com dietil-pirocarbonato (DEPC) e em seguida a placa foi incubada por 10 minutos a 80ºC. A partir desta etapa as amostras foram submetidas à técnica de RT-PCR em tempo real. Abaixo, na **Figura 1,** está representado o mecanismo de ação do método de imunocaptura.

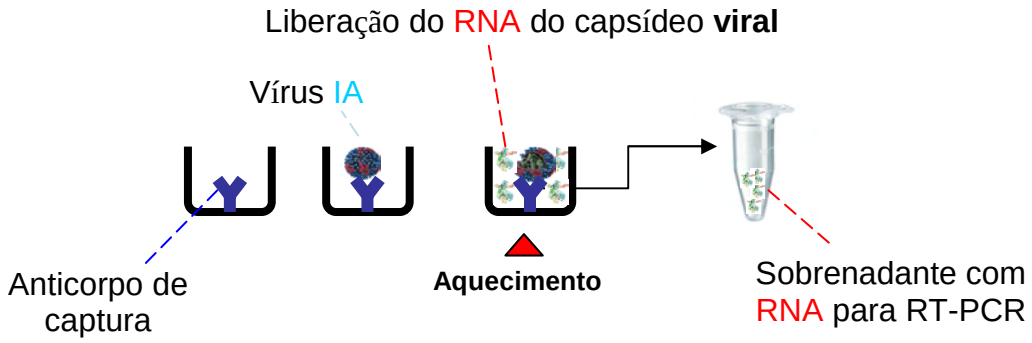

Figura 1. Esquematização do método de Imunocaptura.

4.6 Extração de RNA com Trizol LS Reagent® (Invitrogen, USA)

A extração de RNA com o reagente caotrópico Trizol LS Reagent® (Invitrogen, USA), que a partir de agora será mencionado apenas como TRIZOL, foi realizada conforme instruções do fabricante, mas com algumas modificações. Em resumo, para cada 250µL de amostra, de LCA ou suabes de cloaca e traquéia, foram adicionados 750µL de Trizol LS Reagent. A mistura foi homogenizada por 15 segundos em vórtex. Acrescentou-se 200µL de clorofórmio ultra puro 100% (livre de DNAses e RNAses), realizando-se agitação por inversão. Após um período de 7 minutos à temperatura ambiente (TA), as amostras foram centrifugadas a 12000xg durante 15 minutos a 4℃; aproximadamente 500µL do sobrenadante foram transferidos para outro microtubo, com capacidade para 1,5mL. As amostras de RNA foram precipitadas em 500µL de isopropanol, após incubação de 10 minutos à TA e centrifugação por 10 minutos a 12000xg a 4℃. O isopropanol foi descartado e as am ostras foram lavadas em 1000µL de etanol 70% e secas em TA. Em seguida os precipitados foram ressuspensos em 50µL de água ultra pura tratada com DEPC. O RNA extraído foi armazenado a -80℃ até o momento de sua utilização na reação de RT-PCR.

4.7 Extração de RNA com o kit MagMAX® (Ambion, USA)

O kit MagMAX® (Ambion, USA), que será designado como AMBION daqui em diante, usa esferas (‘beads’) magnéticas para o isolamento de RNA e foi desenvolvido especificamente para a purificação de RNA do vírus de AIV obtidos a partir de amostras de suabes cloacal ou traqueal. Este é o método padrão, já que trata-se da metodologia de obtenção de RNA utilizada e validada pelo National Veterinary Services Laboratory – USDA (Ames, EUA) (NVSL). A extração de RNA foi realizada conforme as instruções fornecidas pelo fabricante. Resumidamente, foram adicionados 101ul da solução de lise em 50ul de amostra e então a microplaca foi agitada, em agitador orbital, por 30 segundos. A esta mistura 20ul de suspensão contendo as ‘beads’ magnéticas foi adicionada a cada cavidade da microplaca e esta

foi agitada por 4 minutos. Então a microplaca foi colocada sobre o suporte magnético, para a captura das ‘beads’ por 2 minutos. O sobrenadante foi aspirado e a microplaca retirada do suporte. Foram realizadas 3 lavagens, cada uma com 100ul, utilizando as soluções presentes no kit e com tempo de incubação de um minuto cada. Depois da última lavagem a microplaca foi agitada durante 2 minutos para a completa secagem dos poços e então foi adicionado 50ul do tampão de eluição e a microplaca foi incubada por 1 minuto sobre o suporte magnético. O sobrenadante, contendo o RNA extraído, foi então armazenado a -80ºC até sua utilização**.**

4.8 Extração de RNA com o equipamento de extração automatizada MagNA Pure LC® (ROCHE, Alemanha)

A extração foi realizada com o kit MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation®, segundo o protocolo recomendado pelo fabricante e processada no equipamento de extração automatizada MagNA Pure LC (Roche, Alemanha) e a partir deste ponto será mencionada apenas como MagNA Pure. Esta metodologia é a adotada pelo Lanagro/SP para o isolamento de RNA para a pesquisa do vírus de AIV. O princípio desta técnica consiste, em resumo, em adicionar a amostra um tampão de lise e proteinase K e após um período de incubação adicionar ‘beads’ magnéticas as quais os ácidos nucléicos serão ligados. Durante as lavagens, que retiram os restos celulares e impurezas presentes na amostra bruta, as ‘beads’ ficam presas a um imã que se move até as ponteiras durante esta etapa do processo. Na fase final da extração, uma solução de eluição é adicionada e os ácidos nucléicos são desprendidos das ‘beads’ por diferença de osmolaridade e aquecimento. A **Figura 2** trás um esquema que apresenta o processo de extração por este método.

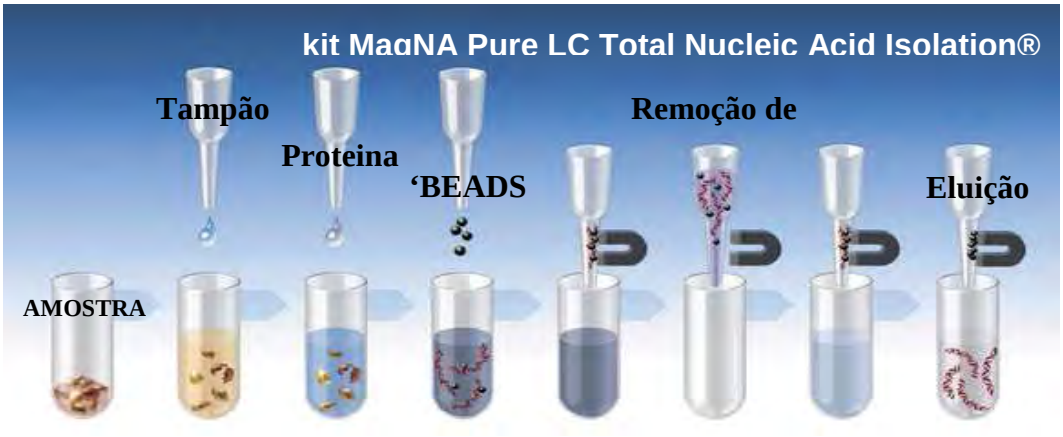

Figura 2. Representação esquemática resumida do princípio da extração de ácidos nucléicos utilizando o o kit MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation® e processada no equipamento de extração automatizada MagNA Pure LC (Roche, Alemanha).

4.9 Oligonucleotídeos Iniciadores utilizados na técnica convencional de RT-PCR

O gene M foi escolhido como alvo deste estudo devido sua alta conservação dentro das diferentes estirpes, sua grande especificidade para o vírus de influenza aviária e por ser o gene alvo adotado pelo protocolo oficial do Center for Disease Control and Prevention (CDC) (Atlanta/USA) e pelo Laboratório Nacional de Referência para a Influenza Aviária do Ministério da Agricultura (Lanagro/SP). O par de oligonucleotídeos iniciadores utilizado no protocolo de RT-PCR convencional está descrito na **Tabela 3**.

Tabela 3. Oligonucleotídeos iniciadores (‘primers’) utilizados na técnica convencional de RT-PCR.

‘Primers’	Sequência (5’–3’)	Localização	Fita	Tamanho produto
MF3/cdc	TGATCTTCTTGAAAATTTGCAG	718-739	‘Foward’	200bp
MR1+/cdc	CCGTAGMAGGCCCTCTTTTCA	909-889	‘Reverse’	

*Sequência dos primers obtida através de comunicação pessoal com o Dr. Ruben Denis.

4.10 RT-PCR convencional

A RT-PCR foi realizada conforme o procedimento recomendado por Spackman et all (2002), e por meio de protocolo validado pelo laboratório do National Veterinary Services Laboratory – USDA (Ames, EUA), que é o laboratório de referencia da OIE para diagnóstico de influenza aviaria e é o mesmo protocolo atualmente adotado pelo Lanagro/SP para o diagnóstico oficial de influenza. A reação de RT-PCR foi realizada em um termociclador Mastercycler (Eppendorf, USA), em um único passo, com o kit AgPath ID One Step RT-PCR® (Ambion, EUA). Uma mistura com os reagentes do kit foi feita com a adição do RT-PCR buffer 2x (Ambion, USA), Ampli Taq Gold DNA Polymerase® (Ambion, USA), 10 pmol de ‘primer foward’, 10 pmol de ‘primer reverse’ e água ultra pura tratada com DEPC suficiente para completar 17µL, a essa mistura foram adicionados 8µL de RNA, quando extraído por um dos três métodos citados no item 4.5, ou no caso das placas de imunocaptura, essa mistura foi diretamente adicionada à microplaca. O perfil térmico desta reação inclui a transcrição reversa com um ciclo de 40 minutos a 42°C e um ciclo de 5 minutos a 95°C; a PCR com 30 ciclos compostos por desnaturação de 1 minuto a 94°C, anelamento a 57°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto e uma extensão final, após a reação de PCR, de 10 minutos a 72°C.

4.11 Eletroforese em Gel de Agarose

Após as reações de PCR, foram adicionados 5µL de tampão de amostra [0,05% (p/v) de azul de bromofenol; 40% de sacarose (p/v); Tris-HCl 10mM pH 7,8 e EDTA 1M pH 8,0] em 25µL de produto amplificado, o qual foi analisado através de eletroforese horizontal no sistema, em tensão de 100V por aproximadamente uma hora, em gel de agarose 3% contendo tampão TBE 0,5X (Tris 0,045M, ácido bórico 0,045M e EDTA 0,001M, pH 8,0) e brometo de etídio (0,5µg/µL). Como padrão de peso molecular foi utilizado o marcador 100bp DNA Ladder® (Invitrogen, USA). Os géis foram visualizados através de incidência de luz ultravioleta em um transiluminador (Loccus, Brasil), processados por meio de sistema de fotodocumentação (Loccus, Brasil).

4.12 RT-PCR em tempo real

Após a extração do RNA ou da imunocaptura método de RT-PCR em tempo real foi realizado, utilizando o kit AIV-M AgPath ID One Step® RT-PCR (Ambion, EUA), sendo a reação conduzida em um aparelho de PCR em tempo real modelo 7500 (Applied Biosystems, USA). Foram utilizados 8µL de RNA, ao qual acrescentou-se 17 µL da mistura dos reagentes presentes no kit, incluindo os oligonucleotídeos iniciadores e sonda específicos para o gene M do vírus de influenza aviária e um controle endógeno (xenoRNA) patenteados e validados pela empresa fabricante. As reações foram realizadas em microplacas especiais, de 96 orifícios com volume de 0,2 mL em cada um, e tampadas com adesivos específicos para a leitura óptica do sistema de detecção e mensuração fotométrica do equipamento de PCR em tempo real. A transcrição reversa compreendeu um ciclo inicial de 30 minutos a 50℃ e outro de 95℃ por 15 minutos. A reação de PCR ocorreu em seguida e foi constituída por 45 ciclos compostos por desnaturação a 94℃ por 15 segundos e uma etapa de anelamento/extensão com 32 segundos a 60℃, na qual a fluorescência foi adquirida pelo equipamento. Todas as amostras foram testadas em triplicata. O valor do ponto

de corte, denominado de “threshold cycle” (Ct), utilizado foi o estabelecido automaticamente pelo software do equipamento e com análise manual para verificação de possíveis erros. A cada microplaca analisada foram adicionados no mínimo três controles negativos da reação de PCR e três controles positivos para gene M do vírus de AIV. Em caso de falha de algum destes controles, positivo ou negativo, a reação era considerada inválida, sendo então repetida.

4.13 Avaliação da Especificidade Analítica do Método de IC-RT-PCR

A especificidade analítica foi avaliada testando-se suspensão de LCA do AIV H2N2 padrão e quatro outros RNA vírus aviários, todos na diluição 10^0. Os RNA vírus testados, com exceção do AIV, foram obtidos a partir de amostras virais provenientes de vacinas vivas atenuadas dos vírus: de Bronquite Aviária, cepas H-120 (Merial, USA) e Ma5 (Intervet/Schering-Plough Animal Health, USA), do vírus da doença de Newcastle, cepas La Sota (Biovet, Brasil) e HB1 (Merial, USA) e do vírus da doença de Gumboro, cepas Lukert (Fort Dodge, USA), S706 (Merial, USA) e 228E (Intervet/ Schering-Plough Animal Health). A especificidade foi testada tanto na reação de RT-PCR convencional, como na RT-PCR em tempo real.

4.14 Preparação das Amostras para Avaliação da Sensibilidade Analítica do Método de IC-RT-PCR

A determinação da sensibilidade analítica foi realizada com suspensões de LCA e suabes cloacais e traqueais. Após a obtenção do LCA, a partir de ovos embrionados SPF, e das suabes de cloaca e traquéia, coletadas de aves SPF, foi realizada a contaminação experimental com uma suspensão de LCA de AIV H2N2 padrão, contendo 1024 UHA, que foi considerada a diluição 10^0. Os diferentes

tipos de amostra (LCA, suabe cloacal e suabe traqueal) foram então diluídas seriadamente em razão 10 (10^{-2} a 10^{-6}) e submetidas a extração com o reagente caotrópico Trizol LS® (Invitrogen, USA), com o kit MagMAX® (Ambion, USA), com o equipamento de extração automatizada MagNA Pure LC® (ROCHE, Alemanha) e com a técnica de Imunocaptura. Posteriormente os RNAs foram analisados em RT-PCR convencional e em tempo real.

As análises foram realizadas em triplicata e cada diluição estudada foi considerada positiva quando obteve dois ou mais resultados positivos.

V. RESULTADOS

5.1 Padronização do teste de Imunocaptura

Foram testados vários parâmetros para o desenvolvimento e a otimização de uma técnica de imunocaptura eficiente. Os principais foram: diferentes combinações das preparações de anticorpos de captura, diferentes concentrações do anticorpo de captura, tempo e temperatura de incubação para a adsorção do anticorpo de captura, composição ideal da solução de bloqueio, a necessidade ou não do tratamento prévio da amostra contendo o AIV, tempo e temperatura de incubação da amostra na placa de imunocaptura, composição das soluções de lavagem das cavidades da microplaca após a captura do AIV e a utilização ou não de um passo de desnaturação do vírus após a imunocaptura.

A utilização de tratamento prévio da amostra foi testada na padronização da técnica de Imunocaptura utilizando inicialmente microplacas impregnadas com soro anti-H2 na concentração 1:50, e as demais etapas do procedimento de Imunocaptura foram as mesmas descritas no tópico Materiais e Métodos. Foram feitos testes com as amostras foram tratadas, na proporção 1:2 com as seguintes soluções: PBS Tween 20 0,05%; PBS 80 0,5%; Triton X-100 0,5% e também foi avaliada a ausência de tratamento prévio. A amostra foi o AIV H2N2 padrão nas diluições finais (após tratamento) 10^{-1}, 10^{-2} e 10^{-3}. A comparação dos resultados obtidos por RT-PCR em tempo real está descrita na **Tabela 4.** Note que, na análise do resultado de RT-PCR em tempo real, quanto menor o valor do Ct maior a concentração de vírus presente na amostra.

Tabela 4. Resultados da RT-PCR em tempo real com os diferentes tipos de tratamentos prévios da amostra de AIV H2N2 padrão nas diluições 10^{-1} a 10^{-3}. Os testes foram realizados em triplicata e os valores apresentados referem-se a média dos Ct obtidos, que possuem DP≤0,50. As áreas em cinza correspondem a opção adotada. Legenda: Ag: AIV H2N2 padrão.

	Sem tratamento	**Tween 20 0,05%**	**Tween 80 0,5%**	**Triton X-100 0,5%**
Ag 10^{-1}	29,27	21,92	25,97	38,52
Ag 10^{-2}	31,97	25,61	32,05	33,48
Ag 10^{-3}	34,73	28,05	30,55	31,63

* Os valores apresentados referem-se ao Ct, que foram considerados **positivos** para AIV os valores de Ct abaixo de 35 e **suspeitos** os valores acima de 36.

O parâmetro verificado em seguida foi a impregnação da microplaca com as soluções: soro total anti AIV H2, fração gama-globulina do soro anti AIV H3 e com a combinação destes dois soros. Para este teste foram utilizadas as diluições de soro 1:50 e 1:200. O resultado desta avaliação foi realizado pela detecção do gene M por RT-PCR em tempo real das diluições 10^{-2} a 10^{-5} do AIV H2N2 padrão e está descrito na **Tabela 5**. Deve-se salientar que, na análise do resultado de RT-PCR em tempo real, quanto menor o valor do Ct maior a concentração de vírus presente na amostra.

Tabela 5. Resultados da RT-PCR em tempo real com os diferentes tipos de combinações de soro que foram utilizadas para impregnar a placa de imunocaptura. Foram usadas para a impregnação da placa diferentes combinações de soro nas diluições 1:50 e 1:200. As amostras testadas foram o AIV H2N2 padrão nas diluições 10^{-2} a 10^{-5}. As áreas em cinza correspondem a opção adotada. Legenda: Ag: AIV H2N2 padrão; IgG: fração imunoglobulina do soro anti-H3; DP: desvio padrão.

	Soro Anti-H2 1:50	**Soro Anti-H2 1:200**	**Soro anti-IgG H3 1:50**	**Soro anti-IgG H3 1:200**	**Soro anti H2 + anti-IgG H3 1:50**	**Soro anti-H2 + anti-IgG H3 1:200**	**Média**	**DP**
Ag 10^{-2}	26,35	25,51	26,14	25,01	23,62	24,73	**25,00**	1,84
Ag 10^{-3}	28,03	26,92	27,78	27,37	26,55	27,20	**27,16**	0,50
Ag 10^{-4}	33,77	32,65	32,17	33,03	33,06	33,29	**32,84**	0,50
Ag 10^{-5}	36,00	32,78	33,95	32,98	33,53	36,22	**33,89**	1,37

* Os valores apresentados referem-se ao Ct, que foram considerados **positivos** para AIV os valores de Ct abaixo de 35 e **suspeitos** os valores acima de 36.

Foi realizada a média e cálculo do desvio padrão (DP) dos valores de Ct obtidos e as diferenças encontradas entre as combinações de anticorpos de captura não foram suficientemente significativas a ponto de destacar uma das opções, por isso foi adotada a combinação de soros anti- AIV H2 com a fração gama-globulina anti AIV H3, com a tentativa de ampliar o espectro de ação da captura.

Para a verificação da capacidade de um soro produzido a partir de um subtipo de AIV capturar um subtipo diferente foram utilizados AIV dos subtipos H3 e H4 nas diluições 10^{-2} e Ag 10^{-3} em uma microplaca impregnada com a combinação de anticorpos escolhida para padrão. Estes resultados, obtidos após a RT-PCR em tempo real estão apresentados na **Tabela 6.**

Tabela 6. Resultados, por RT-PCR em tempo real, da presença de AIV dos subtipos H2, H3 e H4 isolados em placa de Imunocaptura com anticorpos de captura obtidos a partir de AIV H2 e H3 Os testes foram realizados em triplicata e os valores apresentados referem-se a média dos Ct obtidos, que possuem DP≤0,50. Legenda: Ct: "Threshould Cycle"; DP: desvio padrão.

Diluição	AIV **H2**	AIV **H3**	AIV **H4**
10^{-2}	24,73	25,21	27,70
10^{-3}	27,20	30,52	31,99

* Os valores apresentados referem-se ao Ct, que foram considerados **positivos** para AIV os valores de Ct abaixo de 35 e **suspeitos** os valores acima de 36.

As etapas de bloqueio das cavidades da microplaca, lavagem da amostra após a incubação 'overnight' em microplaca de imunocaptura e a desnaturação do vírus quando não efetuadas como descrito no procedimento padronizado final, foram negativas na RT-PCR em tempo real. Os demais parâmetros com resultados não descritos não promoveram melhora significativa no método ou não tiveram variação. O resumo dos diferentes parâmetros testados está descrito na **Tabela 7.**

Tabela 7. Descrição dos parâmetros testados para a otimização do método de Imunocaptura RT-PCR em AIV. As áreas em cinza correspondem as opções adotadas por apresentarem melhor resultado. Legenda: LPS: leite em pó solúvel; BSA: soro albumina bovina.

<table>
<tr><th rowspan="2">Combinação de Soros</th><th rowspan="2">Diluição Soro</th><th rowspan="2">Bloqueio cavidades microplaca</th><th rowspan="2">Tratamento Pré-Amostra</th><th rowspan="2">Lavagem da Amostra</th><th colspan="2">Desnaturação do Vírus</th></tr>
<tr><th>Eluição</th><th>Tratamento Térmico</th></tr>
<tr><td>.soro total anti H2</td><td rowspan="3">.1:50</td><td rowspan="3">LPS 1%</td><td>.sem tratamento</td><td rowspan="2">. PBS Tween 20 0,05% + H2O destilada</td><td rowspan="3">. ÁGUA ULTRAPURA</td><td rowspan="4">. 80 C: 10min</td></tr>
<tr><td rowspan="2">.fração gama globulina do soro anti H3</td><td rowspan="2">.PBS Tween 20 0,05%</td></tr>
<tr><td rowspan="2">. PBS Tween 20 0,05% + Tampão[a]</td></tr>
<tr><td rowspan="2">.soro total anti H2 + fração gama globulina do soro anti H3</td><td rowspan="2">.1:200</td><td rowspan="2">BSA 1%</td><td>.PBS Tween 80 0,05%</td><td rowspan="2">. Tampão[a]</td></tr>
<tr><td>.Triton X-100 0,5%</td><td>. Tampão[a]</td><td>Sem tratamento</td></tr>
</table>

[a] Tampão é constituído por: Tris 20mM + MgCl2 2,5mM + KCl 75mM

5.2 Determinação da especificidade analítica

A especificidade da técnica de IC-RT-PCR convencional e em tempo real foi comprovada através da amplificação de fragmento específico do gene M em suspensão de LCA contaminada com a estirpe H2N2 do AIV. Não houve amplificação de produto genômico para os oito vírus aviários não relacionados ao AIV, isto é, as estirpes H-120 e Ma5 do vírus de Bronquite Infecciosa, as estirpes LaSota e HB1 do vírus da doença de Newcastle e as estirpe Lukert, S706 e 228E do vírus da doença de Gumboro. O resultado da especificidade analítica da IC-RT-PCR encontra-se na **Figura 3**.

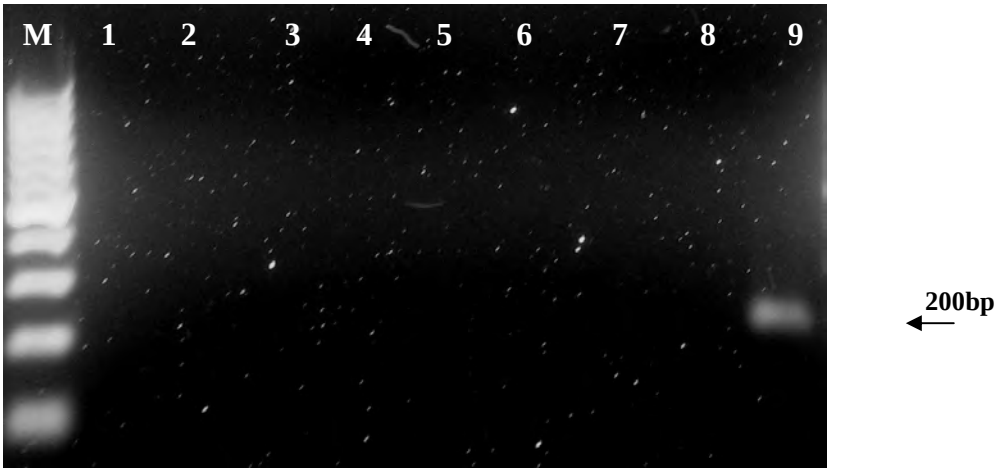

Figura 3. Análise de especificidade do IC-RT-PCR convencional, usando primers MF3/cdc e MR-1/cdc. Legenda: **(M)** Marcador 100bp (Invitrogen), **(1)** Vírus de Bronquite infecciosa estirpe H-120, **(2)** Vírus de Bronquite infecciosa estirpe Ma5, **(3)** Vírus da doença de Newcastle estirpe La Sota, **(4)** Vírus da doença de Newcastle estirpe HB1, **(5)** Vírus de Gumboro estirpe Lukert, **(6)** Vírus de Gumboro estirpe S706, **(7)** Vírus de Gumboro estirpe 228E, **(8)** Controle negativo, **(9)** Vírus de Influenza aviária.

5.3 Avaliação da Sensibilidade Analítica

As análises em RT-PCR convencional com LCA infectado com a estirpe H2N2 do AIV tiveram produto amplificado até a diluição 10^{-3} para a técnica de imunocaptura e com o kit AMBION e até a diluição 10^{-4} para as amostras extraídas com Trizol e MagNA Pure (**Figura 4).**

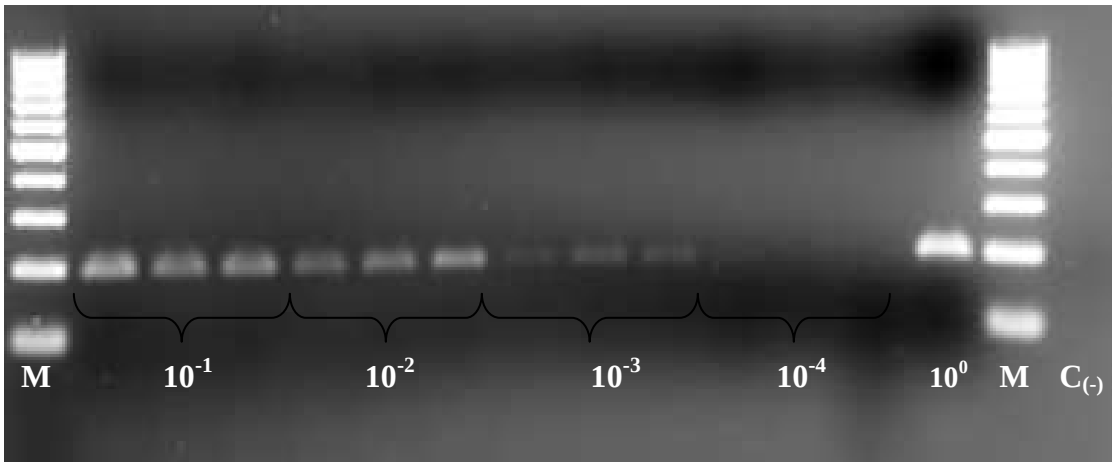

Figura 4. Avaliação da sensibilidade analítica do IC-RT-PCR convencional em relação a diluições seriadas do AIV H2N2 padrão. O LCA foi submetido a diluições seriadas de razão 10 (10^0 a 10^4). Legenda: (M) Marcador 100bp (Invitrogen), ($C_{(-)}$) Controle negativo.

Para a avaliação da sensibilidade analítica em suabes cloacais e traqueais contaminadas experimentalmente e submetidas a RT-PCR convencional a detecção foi até a diluição 10^{-3} para a técnica de imunocaptura e para a extração com o kit extração AMBION e até a diluição 10^{-4} para as amostras extraídas com Trizol e MagNA Purê, as quais equivalem a 0,1 e a 0,01 unidades hemaglutinantes (UHA). Os resultados do RT-PCR convencional das análises com LCA e com suabes de cloaca e traquéia encontram-se descritos na **Tabela 8.**

Tabela 8. Comparação do IC-RT-PCR convencional com diferentes métodos de extração de RNA em LCA e suabes de traquéia e cloaca de aves SPF, contaminadas AIV H2N2 padrão em diluições seriadas (10^{-2} a 10^{-6}). Legenda: **Ag:** AIV H2N2 padrão; **UHA:** unidade hemaglutinantes; **LCA:** líquido cório-alantóide; **IC:** Imunocaptura; **MP:** MagNA Pure LC; **AMB:** Ambion; **TR:** Trizol.

	UHA	**LCA**				**SUABE TRAQUÉIA**				**SUABE CLOACA**			
		IC	**MP**	**AMB**	**TR**	**IC**	**MP**	**AMB**	**TR**	**IC**	**MP**	**AMB**	**TR**
Ag 10^{-2}	1	**POS**	**POS**	**POS**	**POS**	**POS**	**POS**	**POS**	**POS**	**POS**	**POS**	**POS**	**POS**
Ag 10^{-3}	0,1	**POS**	**POS**	**POS**	**POS**	**POS**	**POS**	**POS**	**POS**	**POS**	**POS**	**POS**	**POS**
Ag 10^{-4}	0,01	NEG	**POS**	NEG	**POS**	NEG	**POS**	NEG	**POS**	NEG	**POS**	NEG	**POS**
Ag 10^{-5}	0,001	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
Ag 10^{-6}	0,0001	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG

O resultado em RT-PCR em tempo real com LCA infectado com o AIV H2N2 padrão do AIV foi positivo até a diluição 10^{-4} para a técnica de imunocaptura e com o kit AMBION e até a diluição 10^{-5} para as amostras extraídas com Trizol e MagNA Pure.

A sensibilidade analítica de suabes traqueais e cloacais em RT-PCR em tempo real foram positivos até a diluição 10^{-4} na técnica de imunocaptura e na extração com o kit extração AMBION e até a diluição 10^{-5} com as extrações de RNA com Trizol e com MagNA Pure, as quais equivalem a 0,01 e a 0,001 unidades hemaglutinantes (UHA). Os dados das análises em LCA e em suabes encontram-se descritos na **Tabela 9**.

Tabela 9. Comparação do IC-RT-PCR em tempo real com diferentes métodos de extração de RNA em LCA, suabe de traquéia e suabe de cloaca de aves SPF, contaminadas com o AIV H2N2 padrão em diluições seriadas (10^{-2} a 10^{-6}). Os valores apresentados referem-se ao Ct. São positivos os valores de Ct abaixo de 35 e a partir de 36 as amostras são consideradas suspeitas para a presença de AIV. Legenda: **Ag:** AIV H2N2 padrão; **UHA:** unidade hemaglutinantes; **IC:** Imunocaptura; **MP:** MagNA Pure LC; **AMB:** Ambion; **TR:** Trizol; **LCA:** líquido cório-alantóide.

Diluições	UHA	LCA				SUABE TRAQUÉIA				SUABE CLOACA			
		IC	MP	AMB	TR	IC	MP	AMB	TR	IC	MP	AMB	TR
Ag 10^{-2}	1	29,40	23,66	29,49	24,97	30,41	25,55	30,48	21,36	31,00	25,73	27,15	23,47
Ag 10^{-3}	0,1	32,22	27,81	33,47	30,11	31,88	31,38	35,38	26,47	34,07	30,93	31,98	28,71
Ag 10^{-4}	0,01	33,53	30,23	34,69	34,12	NEG	37,24	NEG	32,58	NEG	37,39	NEG	32,96
Ag 10^{-5}	0,001	NEG	34,05	NEG	35,86	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
Ag 10^{-6}	0,0001	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG

* Os valores apresentados referem-se ao Ct, que foram considerados **positivos** para AIV os valores de Ct abaixo de 35 e **suspeitos** os valores acima de 36.

Em resumo, os resultados obtidos com a imunocaptura e com a extração com o kit AMBION foram iguais, sendo que para AIV presente na suspensão de LCA o limite de detecção correspondeu à diluição 10^{-4}, (0,01 UHA) enquanto que para os suabes cloacais e traqueais eles foram 10 vezes menores e alcançaram até a diluição 10^{-3}. (0,1 UHA) Estes resultados podem ser observados na **Tabela 10**.

Tabela 10. Limites de detecção de amostras de LCA, suabe de traquéia e suabe de cloaca experimentalmente contaminadas com AIV H2N2 padrão com diferentes métodos de extração de RNA, com posterior análise em RT-PCR em tempo real. Legenda: **IC:** Imunocaptura; **MP:** MagNA Pure LC; **AMB:** Ambion; **TR:** Trizol.

	LCA	**Suabe de Traquéia**	**Suabe de Cloaca**
IC	10^{-4}	10^{-3}	10^{-3}
MP	10^{-5}	10^{-4}	10^{-4}
AMB	10^{-4}	10^{-3}	10^{-3}
TR	10^{-5}	10^{-4}	10^{-4}

As vantagens e desvantagens de alguns dos principais parâmetros observados durante a padronização do método de Imunocaptura e com a comparação dos diversos métodos de isolamento de RNA, para posterior análise em RT-PCR em tempo real, utilizados neste trabalho estão descritas na **Tabela 11**.

Tabela 11. Vantagens e desvantagens observadas nos métodos de extração de RNA e no método de Imunocaptura.

Parâmetro	IMUNOCAPTURA	MAGNA PURE®	AMBION®	TRIZOL®
Amostras/ corrida	Microplaca (96 amostras)	Placa especial (32 amostras)	Microplaca (96 amostras)	Microtubo (poucas)
Habilidade do operador	Média	Pouca	Média	Alta
Tempo do processo	Médio	Baixo	Baixo	Médio
Contaminação cruzada	Baixa	Baixa	Baixa	Alta
Reagentes tóxicos	NÃO	NÃO	NÃO	SIM
Sensibilidade	BOA	ÓTIMA	BOA	ÓTIMA
Custo	BAIXO	ALTO	ALTO	BAIXO

VI. DISCUSSÃO

No presente estudo um método prático de imunocaptura para a obtenção de RNA viral a partir de suspensões brutas de líquido cório-alantóide, ou de suabes traqueais ou cloacais foi adaptado e padronizado para a detecção do vírus de Influenza aviária.

Ao contrário dos métodos tradicionais, baseados na detecção de genoma viral, a técnica de IC-RT-PCR foi concebida para detectar o RNA viral liberado a partir dos capsídeos virais capturados na superfície das cavidades de um suporte sólido (microplaca de poliestireno). A técnica de IC-RT-PCR foi desenvolvida e aplicada com sucesso para a detecção de vários patógenos virais (GALL-RECULÉ et al., 2001; LUNELLO et al., 2004; KOGOVSEK et al., 2008; PIZA, 2008).

Para a aplicação deste método na detecção do AIV foi necessária a modificação e otimização de várias etapas. Alguns dos procedimentos adotados na padronização realizada no presente estudo não diferiram muito da literatura como por exemplo o número de lavagens após a incubação da amostra na imunoplaca. Assim como Gall-Reculé et al (2001) e Piza (2008) que trabalharam com amostras de órgãos o PBS Tween 20 foi a solução que proporcionou melhores resultados, apesar de ter sido suficiente apenas metade do número de vezes que estes autores lavam a placa, o que acarreta em uma rapidez um pouco maior nesta etapa, sendo também vantajosa essa mudança aqui adotada, ao se considerar que o processo de pipetagem e o cuidado necessário para evitar contaminação cruzada. Jansen et al (1990) e Graff et al (1993) que trabalharam com amostras contendo fezes, e portanto semelhantes às suabes de cloaca, tiveram que fazer 5 ou 6 lavagens e no lugar de PBS Tween 20 usaram um tampão de composição diferente, talvez por trabalharem com vírus não envelopados. Essa solução de tampão de lavagem também foi testada em nosso estudo e ao invés de terem sido obtidos resultados melhores, ela resultou em ausência de visualização de sinal de amplificação ao final da RT-PCR, tanto

realizada pelo método convencional quanto por tempo real. Talvez o número excessivo de lavagens para uma amostra que não tenha tanta sujidade, quanto as utilizadas por estes autores tenha eliminado as partículas virais de Influenza ou alguma outra modificação de na incubação da amostra permita a utilização deste tampão por tantas vezes, passo que pode ser útil quando a pesquisa viral for necessária em amostras com tal concentração de resíduos e contaminantes.

Uma etapa crucial para a Imunocaptura do AIV funcionar é a desnaturação do vírus. Aparentemente nem todo vírus precisa desta etapa, no procedimento de imunocaptura. O vírus de BI por exemplo, Piza (2008) realizou a transcrição reversa imediatamente após a imunocaptura com resultados satisfatórios, o que não ocorreu com o AIV, onde o aquecimento de 50ºC para a transcrição reversa não foi suficiente para o rompimento do envelope viral, nos testes nos quais esse passo foi suprimido o resultado foi 100% negativo, independente da concentração de antígeno presente na amostra ou no controle positivo. Apenas com a desnaturação, em água ultra-pura com inibidor de RNAse, a 80ºC por 10 minutos é que foi possível a liberação do RNA viral e sua utilização no diagnóstico por RT-PCR.

Outro procedimento adotado foi o pré-tratamento da amostra, o que parece ainda pouco usual para outros vírus. Gambley et al (2009), que trabalhou com um ampelovirus responsável pela doença da murcha do abacaxi, fez extratos de pequenas frações das amostras de folha de abacaxi com uma solução contendo Triton X-100 4%, já que necessitava de um detergente forte para romper a cutícula foliar e as células do parênquima. O teste utilizando Triton X-100 foi o que forneceu piores resultados, confirmando que o Triton x-100 é mais indicado para lise de células vegetais ricas em lipídeos e que deve ser evitada quando o vírus se encontra em suspensão. O detergente mais eficiente para o preparo prévio foi o PBS Tween 20 0,05%, resultado também encontrado por Gall-Reculé et al (2001), que usou esta estratégia no diagnóstico do vírus da doença hemorrágica de coelhos a partir de exudato de fígado, uma amostra também com bastante resíduos, porém de mais fácil lise.

O uso da preparação de anticorpos de captura composta pela combinação de soros anti-H2 e a fração imunoglobulina anti-H3 foi adotado apenas para a tentativa de ampliação de espectro de ação da captura de partículas virais, já que não houve diferença significativa da sensibilidade com a utilização de soros anti-H2 ou anti-H3. Apesar de que a sensibilidade parece não estar diretamente ligada às diferenças na hemaglutinina e sim aos antígenos mais conservados constituídos pela proteína de nucleocapsídeo e pela glicoproteína de matriz, pois o soro com anticorpos produzidos a partir de AIV dos subtipos H2 e H3 foram capazes de capturar AIV H4, como demostrado nos resultados. A diferença no valor dos Cts não pode ser usada com segurança para discussão do aumento de sensibilidade para um ou outro subtipo pois, apesar dos AIV estarem na mesma diluição, possuem títulos virais distintos, o que inclusive parece influenciar mais nesta diferença do que a origem do anticorpo de captura. Além disso, para uma análise mais aprofundada deste aspecto poderia ser feita a utilização de anticorpos monoclonais que podem trazer um aumento de sensibilidade para um subtipo específico, estratégia já utilizada por Nolasco et al (1993), em detecção de vírus fito-patogênicos. Um exemplo ainda mais aplicado de tais tipos de imuno-reagentes, seria a utilização da Imunocaptura com um grupo de anticorpos monoclonais específicos para a detecção de subtipos de maior prevalência em aves migratórias, os AIV H2, H3 e H4 que serviriam para o monitoramento de aves migratórias, gerando uma base de dados valiosa para o estudo epidemiológico da influenza aviária e possibilitando inclusive seu isolamento para posterior seqüenciamento e análises filogenéticas.

Os demais parâmetros de padronização da técnica que foram citados e cujos resultados não foram descritos não promoveram melhora significativa no método ou não tiveram variação.

Quanto à sensibilidade analítica, o limite de detecção para o RNA extraído de suspensões de LCA infectadas com o AIV foi dez vezes maior para as técnicas já padronizadas utilizando o Trizol ou o MagNA pure do que para as técnicas de imunocaptura e com base no kit Ambion. Essa mesma diferença foi observada no teste das amostras de suabes traqueais ou cloacais contaminados com o AIV,

exceto que houve a redução de uma diluição de razão 10, no limite de detecção para quaisquer das quatro técnicas de extração do RNA avaliadas nesse estudo. Nesse contexto, a da análise do LCA dos ovos SPF inoculados no isolamento viral, podem adiantar o diagnóstico, pois em caso positivo as amostras podem ser encaminhadas para a caracterização viral, destacando que o resultado somente será oficial após a realização de três passagens em ovos SPF embrionados (Manual OIE, 2004; MAPA, 2009).

Os resultados obtidos pela amplificação do gene M do AIV através da RT-PCR em tempo real mostrou que ambos os métodos apresentaram sensibilidade equivalente, e tiveram o mesmo limite de detecção mínimo (resultado positivo até a diluição 10^{-4} da suspensão do LCA contaminado com o AIV). Nesse contexto, deve-se considerar que um resultado bastante similar ao obtido neste trabalho, foi relatado no estudo de DAS et al (2009), no qual seis métodos de extração de RNA de AIV H5N1 foram comparados e o kit MagMAX teve um excelente resultado com amplificação do gene M em RT-PCR em tempo real até a diluição 10^{-4} de suspensão de AIV em LCA.

Dentre as possíveis desvantagens dos métodos já padronizados para a extração de RNA viral a serem empregados na técnica de RT-PCR, destaca-se a necessidade de procedimentos envolvendo, ou o uso de solventes orgânicos como o fenol (método do Trizol), ou métodos caros como os representados pelos kits comerciais usando colunas de afinidade (por exemplo os kits: RNeasy Mini Kit e QIAamp Viral RNA Mini Kit, ambos produzidos pela QIAGEN®), ou então “beads” magnéticas com afinidade para os ácidos nucléicos (por exemplo o kit MagMAX – Ambion e o Magnapure - Roche). Na verdade, o que se constata é que, com o objetivo de contornar algumas dessas dificuldades e tornar o processo mais prático e rápido, estão disponíveis diversos kits comerciais para a extração de RNA de amostras biológicas sem a necessidade de concentrar ou purificar previamente os vírus porventura aí presentes, sendo que alguns deles inclusive foram aplicados de forma bem sucedida para o AIV (DENG et al, 2005; TEWARI et al, 2007; DAS et al, 2009). No entanto, a utilização desses kits é cara, especialmente quando for necessário o processamento de um maior número de

amostras e a aquisição por importação (NOLASCO et al, 1993; GALL RECULÉ, 2001; KOGOVSEK et al, 2008).

Assim, a utilização da metodologia de imunocaptura seria útil e eficaz para a detecção do AIV presente em determinados tipos de amostras como LCA e suabes traqueais e cloacais, obtidos de galinhas ou de aves silvestres e que contêm usualmente compostos orgânicos complexos e com potente atividade inibidora da PCR. Além disso, a técnica de IC-RT-PCR evita o uso de fenol ou de outros solventes orgânicos e atua na eliminação de substâncias inibitórias da PCR que, segundo SUAREZ et al (2007) podem estar presentes em amostras biológicas brutas, tendo ainda a vantagem de ser mais barata do que os demais procedimentos de extração de RNA (JANSEN et al, 1990; WETZEL et al, 1992; GRAFF et al, 1993; NOLASCO et al, 1993; GALL RECULÉ et al., 2001; YU et al., 2005).

Ademais, a técnica de imunocaptura RT-PCR combina as vantagens do RT-PCR com métodos mediados por anticorpos, havendo na literatura diversos casos de sucesso de detecção pela técnica de RT-PCR de genes de RNA vírus através da utilização da técnica de imunocaptura, como por exemplo para o vírus da hepatite A descrito por JANSEN et al. (1990) e por GRAFF et al. (1993), do enterovírus por pesquisa realizada por SHEN et al. (1997) e do vírus da Bronquite Infecciosa das aves por Montassier et al., (2006) e PIZA (2008). Este 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 GALL-RECULÉ et al. (2001) e KOGOVSEK et al. (2008) para microplacas de poliestireno, seguindo-se as recomendações de YU et al. (2005), a fim de simplificar os passos das lavagens da superfície sólida de captura desta reação. Estas modificações, principalmente o uso de microplacas com 96 cavidades, possibilitam maior rapidez e simplicidade para o processamento de um grande número de amostras.

Amostras de suabes traqueal e cloacal são indicados pela OIE para o diagnóstico laboratorial da infecção pelo AIV, especialmente em aves sem sinais clínicos de infecção ativa ou para análise em protocolos de vigilância ativa, em

adição às amostras de tecidos e/ou órgãos de aves suspeitas da infecção. Os suabes se constituem nas formas mais comumente utilizadas para detecção do AIV (MALIK et al., 2004; KARLSSON et al., 2007; TEWARI et al., 2007 e ALEXANDER, 2008), tanto para coletas de rotina destinadas à monitoria ativa, como passiva da infecção pelo AIV. Dessa forma, é interessante destacar que a técnica de IC-RT-PCR e o protocolo utilizando extração de RNA por 'beads' magnéticas (AMBION) tiveram o mesmo limite de detecção em RT-PCR em tempo real tanto em suabes de cloaca como de traquéia, chegando a amplificar até as amostras com diluição 10^{-4}, sendo que a primeira metodologia pode ser utilizada em condições mais simples de laboratório, não exigindo, por exemplo, o uso de centrifugação, bastando o laboratório contar com uma estrutura base para processamento da técnica de ELISA. Os protocolos utilizando isolamento de ácidos nucléicos com reagente orgânico (Trizol®) e com o método de extração automatizado (MagNA Pure®) detectaram uma diluição a mais (10^{-4}) para as suabes de cloaca e traquéia, mas deve-se atentar que apesar do limite de detecção coincidir com o obtido com a extração com Trizol, o valor do Ct foi acima de 36, valor considerado suspeito. Esse valor de Ct considerado suspeito, com a extração com o MagNa Pure, aparece tanto para suabe cloacal quanto para traqueal. Esta diferença sugere que o tipo de amostra, com característica alta prevalência de contaminantes e outros ácidos nucléicos em geral e a utilização de um kit para extração de ácidos nucléicos totais, usado como padrão pelo órgão oficial do MAPA (Lanagro/SP) possui uma influência significativa sobre esta técnica.

Ainda ao se considerar os diferentes métodos disponíveis para a extração de RNA do AIV pode-se destacar algumas vantagens e desvantagens para cada uma delas. Dentre as vantagens podem ser destacado que os métodos que utilizam microplacas, devido a facilidade de manipulação de um maior número de amostras por vez, como é o caso da Imunocaptura e do kit da Ambion, permitem o processamento de até 96 amostras em uma única corrida de processamento. A habilidade necessária para o processamento das técnicas varia bastante de uma para outra. Enquanto que para a realização da Imunocaptura e do kit da Ambion é

necessário apenas um treinamento básico para pipetagem, que se consitui em uma etapa crítica do processo e essencial para a obtenção de bons resultados, para a extração de RNA com Trizol, é necessário um pouco mais de habilidade do operador e atenção à todas etapas, com destaque para a transferência da fase aquosa na separação da orgânica e ao secar o pellet, onde o RNA já está precipitado e em geral não é facilmente visível a olho nu. Por outro lado, a extração com o kit MagNa pure requer apenas a colocação das amostras e dos reagentes no equipamento automatizado e uma programação bastante simples do software, deixando o operador livre para outras atividades dentro do laboratório enquanto o equipamento sozinho realiza a extração, o que não ocorre nos outros métodos. A presença de um técnico especializado para a extração com Trizol é obrigatória, devido às várias manipulações necessárias e a quantidade limite para processamento é limitada de acordo com a capacidade de tubos da centrífuga, além do risco de contaminação cruzada e da utilização de reagentes tóxicos (trizol e clorofórmio). O kit Ambion e a Imunocaptura são métodos relativamente rápidos. O kit Ambion tem tempos de incubação rápidos não passando de 5 minutos e podendo ser realizada uma corrida em cerca de 40 minutos, por trabalhar com microplacas o rico de contaminação cruzada diminui e o resultado é bastante satisfatório. A Imunocaptura, apesar de ter etapas “overnight”, podem ser previamente preparadas, fazendo com que o tempo em que o operador deve estar presente, durante, as etapas subseqüentes não seja muito grande, o que permite a realização de outras atividades no laboratório. A contaminação cruzada entre as amostras também é baixa no método de IC, em razão do uso de microplaca e, em adição a isso tudo, o custo é o mais baixo dentre todos os métodos de extração empregados nesse estudo, principalmente se o laboratório tiver auto-suficiência para a produção do antissoro. A extração com Trizol também é relativamente barata, já que utiliza reagentes bastante comuns de laboratório. Alguns aspectos relacionados às vantagens e desvantagens dos métodos de extração de RNA com Trizol e imunocaptura são contrastantes quando comparados aos kits comerciais, isto é, o kit da Ambion por tratar-se de um produto importado e específico para detecção dos vírus de Influenza e Newcastle e no caso do kit MagNA Purê

(ROCHE), por que todos os insumos e reagentes são específicos e comercializados exclusivamente por uma empresa, que determina os altos preços do equipamento, dos insumos e do serviço de manutenção, essenciais para se alcançar e manter um elevado padrão de qualidade dos resultados finais obtidos.

Em resumo, algumas vantagens mais evidentes da técnica de IC-RT-PCR, são a redução do número de passos, a minimização do risco de contaminação entre amostras, por evitar a manipulação de produtos tóxicos usados na extração de RNA viral, como no caso do uso de reagente caotrópicos, e de proporcionar uma maior rapidez na execução e na obtenção de resultados tal como haviam relatado Jansen et al. (1990).

Pode-se inferir 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 AIV presentes em amostras de LCA ou em amostras de suabes cloacal e traqueal infectadas experimentalmente, como a técnica de RT-PCR em tempo real.

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 do vírus da influenza aviária, mesmo por laboratórios dotados de uma infra-estrutura mais simples.

VII. CONCLUSÃO

A técnica apresentada neste trabalho foi específica para a detecção do AIV nas técnicas de RT-PCR convencional e de RT-PCR em tempo real, não havendo amplificação quando testado frente a amostras contendo RNA vírus não relacionados ao AIV, como o vírus da doença de Newcastle, o vírus da Gumboro ou o vírus da bronquite infecciosa das aves. O método de imunocaptura associado com RT-PCR convencional ou com RT-PCR em tempo real obteve sensibilidade analítica equivalente a métodos de extração de ácidos nucléicos utilizados nos laboratórios de referência para diagnóstico de Influenza aviária.

Embora mais pesquisas sejam necessárias para testar outros subtipos de AIV e outros tipos de amostras, como sangue e tecidos, bem como amostras de campo de frangos, galinhas de postura, reprodutores mantidos em criações avícolas comerciais e também em aves silvestres aquáticas, o procedimento descrito neste estudo revelou ser útil e eficiente para o diagnóstico laboratorial e para a realização de estudos epidemiológicos, por ser um método relativamente rápido e muito fácil de executar e que permite uma detecção eficiente, sensível e específica da AIV por RT-PCR, mesmo em amostras ricas em substâncias inibidoras da PCR, como é o caso de amostras de suabe cloacal.

Finalizando, essa nova metodologia ora desenvolvida pode proporcionar ganho de tempo, redução no risco de contaminação entre amostras e pode contribuir significantemente com os estudos de epidemiologia molecular do AIV.

VIII. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A técnica de IC-RT-PCR é eficiente para ser usada no diagnóstico direto do AIV.

A sensibilidade e especificidade analítica da técnica IC-RT-PCR para a detecção do AIV foi idêntica ao do método de RT-PCR utilizando o método de extração AMBION e similar a que foi encontrada pelos métodos de extração com TRIZOL ou com o kit MagNA Pure.

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.

IX. REFERÊNCIAS

Aamir U B, Wernery U, Ilyushina N e Webster. Characterization of avian H9N2 influenza viruses from United Arab Emirates 2000 to 2003. Virology, 2007. 361: 45–55.

Akita E M, Nakai S. Comparison of four purification methods for the production of immunoglobulins from eggs laid by hens immunized with an enterotoxigenic E. coli strain. Journal of Immunological Methods, 1993. 160: 207-214.

Alexander DJ. Avian Influenza – Diagnosis. Zoonoses Public Health 2008; 55:16-23.

Belser J A, Szretter K J, Katz J M e Tumpey T M. Advances in Virus Research - Volume 73. New York: Elsevier, 2009.

Berchieri Jr A; Macari, M. Doença das aves. 1 ed. Campinas: FACTA, 2000.

Bragstad K, Jorgensen P H, Handberg K, Hammer A S, Kabell S e Fomsgaard A. First introduction of highly pathogenic H5N1 avian influenza A viruses in wild and domestic birds in Denmark, Northern Europe. Virology Journa,l 2007. 4:43.

Cattoli G e Terregino C. New Perspectives in Avian Influenza Diagnosis. Zoonoses Public Health, 2008. 55: 24–28.

Chandrasekaran A, Srinivasan A, Raman R, Viswanathan K, Raguram S, Tumpey T M, Sasisekharan V e Sasisekharan R. Glycan topology determines human adaptation of avian H5N1 virus hemagglutinin. Nature Biothecnology, 2008. 26(1): 107-113.

Das A, Spackman E, Pantin-Jackwood M J, Suarez D L. Removal of real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) inhibitors associated with cloacal swab samples and tissues for improved diagnosis of Avian influenza virus by RT-PCR. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 2009. 21:771–778.

Duan L, Campitelli L, Fan X H, Leung Y H C, Vijaykrishna D, Zhang J X, Donatelli I, Delogu M, Li K S, Foni E, Chiapponi C, Wu W L, Kai H, Webster R G, Shortridge K F, Peiris J S M, Gavin J D, Smith G J D, Chen H e Guan Y. Characterization of Low-Pathogenic H5 Subtype Influenza Viruses from Eurasia: Implications for the Origin of Highly Pathogenic H5N1 Viruses. JOURNAL OF VIROLOGY, 2007. 81: 7529–7539.

Easterday BC, Hinshaw VS, Halvorson D A. Influenza. In: Calnek, B.W. (Ed.), Diseases of Poultry. 10ª ed. Ames: Iowa State University Press, 1997.

Gall-Reculé GL; 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. Journal of Virological Methods, 2001; 97(1):49-57.

Gilpatrick S G, Schwab K J, Estes M K e Atmar R L. Develoment of na immunomagnetic capture reverse transcription PCR assay for the detection of Norwalk vírus. Journal of Virological Methods, 2000. 90: 69-78.

Graff J, Ticehurst J, Flehmig B.Detection of Hepatitis A Virus in Sewage Sludge by Antigen Capture Polymerase Chain Reaction. Applied and Environmental Microbiology 1993; 59(10):3165-3170.

Guan,Y, Shortridge, K F, Krauss, S e Webster, R G. Molecular characterization of H9N2 influenza viruses: were they the donors of the ‘‘internal’’ genes of H5N1 viruses in Hong Kong. Proc National Academy Science USA, 1999. 96, 9363–9367.

Harris A, Cardone G, Winkler D C, Hwymann J B, Brecher M, White J M e Steven A C. Influenza virus pleiomorphy characterized by cryoelectron tomography. PNAS, 2006. 103(50): 19123–19127.

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. Archives of Virology, 2003. 148(6): 1158-1193.

Hoffmann E, Stech J, Leneva I, Krauss S, Scholtissek C, Chin P S, Peiris M, Shortridge K F e Webster R G. Characterization of the influenza A virus gene pool in avian species in southern China: was H6N1 a derivative or a precursor of H5N1? Journal of Virology, 2000. 74: 6309–6315.

Horimoto T, Murakami S, Muramoto Y, Yamada S, Fujii K, Kiso M, Iwatsuki-Horimoto K, Kino Y e Kawaoka Y.Enhanced growth of seed viruses for H5N1 influenza vaccines. Virology, 2007. 366:.3–27.

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. Journal of Methods, 1998.74(2):167-178.

Jansen RW, 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 1990; 7:2867-2871.

Karlsson M, Wallensten A, Lundkvist A, Olsen B, Brytting M. A real time PCR assay for the monitoring of influenza A virus in wild birds. Journal of Virological Methods 2007; 144:27-31.

Kogovsek P, Gow L, Pompe-Novak M, Gruden K, Foster GD, Boonham N, Ravnikar M. Single-step RT real time PCR for sensitive detection and discrimination of potato virus Y isolates. Journal of Virological Methods 2008; 149: 1-11.

Kumar R, Halder P, Poddar R. Adaptive molecular evolution of virulence genes of avian influenza – A virus subtype H5N1: An analysis of host radiation. Bioinformation 2006; 1(8):321-326.

Lau LT, Banks J, Aherne R, Brown IH, Dillon N, Collins RA, Chan KY, Fung YWW, Xing J, Yu ACH. Nucleic acid sequence-based amplification methods to detect avian influenza virus. Biochemical and Biophysical Research Communications 2004; 313:336-342.

Lebarbenchon C, Werf S, Thomas F, Aubin JT, Azebi S, Cuvelier F, Roche B, Guégan JF, Renaud F, Clerc MG. Absence of detection of higly pathogecic H5N1 in migratory waterfowl in southern France in 2005-2006. Infection, Genetics and Evolution 2007; 7:604-608.

Lin X, Zhao Z, Tian G, Chen W, Chen P, Yu K, Lin XM, Zhao ZL, Tian GB, Chen WF, Chen PY, Yu KZ. Comparison of sensitivity among indirect ELISA, haemagglutinin inhibition (HI) and AGP tests for detecting antibodies against avian influenza A virus in chickens. China Journal Veterinary Scientific, 1998. 18(5): 454-456.

Lunello P, Mansilla C, Conci V e Ponz F. Ultra-sensitive detection of two garlic potyviruses using a real-time fluorescent (Taqman®) RT-PCR assay. Journal of Virological Methods, 2004. 118:15–21.

Malik YS, Patnayak DP, Goyal SM. Detection of three avian respiratory viruses by single-tube multiplex reverse transcription–polymerase chain reaction assay. Journal Veterinary of Diagnostic Investigation 2004; 16:244-248.

MAPA. Plano de Contingência a Influenza Aviaria e Doença de Newcastle. Versão 1.3. julho/2009. Programa Nacional de Sanidade Avícola, Coordenação de Vigilância e Programas Sanitários, Departamento de Defesa Animal, Secretaria de Defesa Agropecuária, Ministério da Agricultura e Abastecimento, Brasília.

MAPA. Projeto de Vigilância Ativa da Doença de Newcastle e da Influenza Aviária, Manual de Procedimentos Operacionais, Versão Preliminar, Programa Nacional de Sanidade Avícola, Coordenação de Vigilância e Programas Sanitários, Departamento de Defesa Animal, Secretaria de Defesa Agropecuária, Ministério da Agricultura e Abastecimento, Brasília, 2001.

Montassier MFS, Piza VMT, Okino CH, Richtzenhaim LJ, Montassier HJ. Lectin-Capture RT-PCR (LC-RT-PCR) for the detection of avian infectius Bronchitis virus. V International Symposium on Avian Corona and Pneumoviruses 2006; 257-266.

Mukhtar M M, Rasool S T, Song D, Zhu C, Hao Q, Zhu Y e Wu J.Origin of highly pathogenic H5N1 avian influenza virus in China and genetic characterization of donor and recipient viruses. Journal of General Virology, 2007. 88: 3094–3099.

Munford R A, Seal S E. Rapid single-tube immunocapture RT-PCR for detection of two yam potyviruses. Journal of Methods, 1997.69(1-2):73-79.

Nolasco G, Blas C, Torres V, Ponz F. A method combining immunocapture and PCR amplification in a microtiter plate for the detection of plant viruses and subviral pathogens. Journal of Virological Methods 1993; 45(2):201-218.

OIE – Organização Internacional de Saúde Animal. Manual of Diagnostics Tests and Vaccines. Código Zoosanitário Internacional. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Parte 2, Seção 2.1, Capítulo 2.1.14., atualização 2009 capitulo 2.7.12. Avian Influenza. 2009.

Pelzel, AM, McCluskey BJ, Scott AE. Review of the highly pathogenic avian influenza outbreak in Texas. Journal of American Veterinary Medicine Association 2006; 228:1869–1875.

Piza VMT. Detecção e diferenciação do vírus da Bronquite Infecciosa pela técnica de Imunocaptura-RT-PCR e RFLP. [Dissertação]. Jaboticabal (SP): Universidade Estadual Paulista; 2007.

Ruest A, Michaud S, Deslandes S, Frost EH. Comparison of the directigen flu A+B test, the QuickVue Influenza Test and clinical case definition to viral culture and reverse transcription-PCR for rapid diagnosis of influenza virus infection. Journal of Clinical Microbiology 2003; 41(8):3487-3493.

Shen S, DesselbergerU, McKee TA. The development of an antigen capture polymerase chain reaction assay to detect and type human enteroviruses. Journal of Virological Methods 1997; 65:139-144.

Spackman E, Senne DA, Myers TJ, Bulaga LL, Garber LP, Perdue ML, Lohman K, Daum LT, Suarez DL. Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes. Journal of Clinical Microbioly 2002; 40:3256–3260.

Spackman E, Senne A, Bulga LL, Myers TJ, Perdue ML, Garber LP, Lohman K, Dauum LT, Suarez ML. Development of real-time RT-PCR for the detection of avian influenza virus. Avian Disease 2004; 47:1079-1082.

Spackman E. Avian Influenza Virus. 1 ed. Athens: Human Press, 2008.

Stephenson I, Nicholson K G, Wood J M, Zambon M C, e Katz J M. Confronting the avian influenza threat: Vaccine development for a potential pandemic. Lancet Infectious Disease, 2004. 4(8):499–509.

Suarez DL, Das A, Ellis E. Review of rapid molecular diagnostic tools for avian influenza vírus. Avian Diseases 2007; 51:201-208.

Swayne DE, Halvorson DA. Influenza. In: Saif YM, Barnes HJ, Glisson JR, Fadly AM, McDougald LR, Swayne DE, editors. Diseases of poultry. Ames: Iowa State University Press; 2003. p.135–60.

Swayne, D. E., and D. L. Suarez. Highly pathogenic avian influenza. Scientific Technology 2000; 19:463–482.

Tewari D, Zellers C, Acland H, Pedersen JC. Automated extraction of avian influenza virus for rapid detection using real time RT-PCR. Journal of Clinical Virology 2007; 40:142-145.

Timothy KW, Cheung W, Poon LLM. Biology of Influenza A virus. Annals of New York Academy Scientific 2007; 1102:1-25.

Vahlenkamp T W e Harder T C, Influenza virus infections in mammals. Berl Munch Tierarztl Wochenschr, 2006. 119(3–4):123–131.

Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawaoka Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. Revista de Microbiologia 1992; 56(1):152-179.

Wetzel T, Candresse T, Macquaire G, Ravelonandro M, Dunez J. A highly sensitive immunocapture polymerase chain reaction method for plum pox potyvirus detection. Journal of Virology Methods, 1992. 39(1-2): 27-37.

WHO – World Health Organization. Cumulative Number of Confirmed Human Cases of Avian Influenza A/(H5N1) Reported to WHO. Disponível em: <http:// www.searo.who.int >. Acesso em: 44 jun. 2010.

Widjaja L, Krauss SL, Webby RJ, Xie T, Webster RG. Matrix gene of influenza A viruses isolated from aquatic birds: Ecology and emergence of influenza A viruses. Journal of Virology 2004; 78(16):8771-8779.

Yu C, Wu J, Zhou X. Detection and subgrouping of Cucumber mosaic virus isolates by TAS-ELISA and immunocapture RT-PCR. Journal of Virological Methods 2005; 123:155-161.