

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

**DESENVOLVIMENTO DA TÉCNICA DE RT-PCR-ELISA
PARA A DETECÇÃO DO VÍRUS DA BRONquite
INFECCIOSA DAS AVES (VBI)**

Renato Luís Luciano

Médico Veterinário

Junho de 2003

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

**DESENVOLVIMENTO DA TÉCNICA DE RT-PCR-ELISA PARA
A DETECÇÃO DO VÍRUS DA BRONquite INFECCIOSA DAS
AVES (VBI)**

Renato Luís Luciano

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 (Microbiologia).

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Junho de 2003

Luciano, Renato Luís
L937d Desenvolvimento da técnica de RT-PCR-ELISA para a detecção
do Vírus da Bronquite Infecciosa das aves (VBI) / Renato Luís
Luciano. -- Jaboticabal, 2003
xi, 68 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2003
Orientador: Hélio José Montassier
Banca examinadora: José Moacir Marin, Liana Brentano
Bibliografia

1. Bronquite infecciosa das aves. 2. RT-PCR-ELISA.
3. Diagnóstico viral. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:577.213.3/215:578-2

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

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

RENATO LUÍS LUCIANO - nascido em São Paulo, no dia 11 de maio de 1975, graduou-se em Medicina Veterinária pela Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) em julho de 2000. Entre março e maio de 2000, realizou o estágio obrigatório do curso de graduação na área de Virologia, no Centro Nacional de Pesquisa de Suínos e Aves (CNPISA), órgão da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), sob a supervisão da Dra. Liana Brentano. Entre os anos de 1999 e 2000, desenvolveu a Iniciação Científica na área de biologia molecular sob a orientação do Dr. Luiz Ricardo Goulart, professor do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia e responsável pelo Laboratório de Genética Molecular (UFU). Em 2000, desenvolveu a monografia de conclusão de curso intitulada "Otimização do diagnóstico molecular do vírus da Leucose Aviária subgrupo J (VLA-J)" orientado pelo Dr. Paulo Lourenço da Silva, professor adjunto da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia.

Ofereço

Aos meus pais,

Marcio e Ivete

Vocês forneceram todo o suporte necessário para que eu pudesse ter chegado até aqui. O amor, carinho e dedicação de vocês foram essenciais, não somente na minha formação, como também no meu desenvolvimento. Palavras não são suficientes para expressar a minha gratidão...

Aos meus irmãos,

André e Fábio

Nossa convivência permitiu-me desenvolver qualidades que considero imprescindíveis para os relacionamentos com as demais pessoas. Muito obrigado!!!

Dedico

À minha esposa Eliana,

Seu amor, carinho e compreensão foram fundamentais para que pudesse superar todas as dificuldades deste período. A ausência, que se fez necessária em vários momentos desta trajetória, serviu para confirmar o quanto nosso relacionamento é intenso e duradouro.

***"Melhor é serem dois do que um... porque se caírem um levanta o companheiro..."
(Ec. 4.9-10).***

AGRADECIMENTOS

A DEUS, o princípio e o fim de todas as coisas...

Ao Prof. Dr. Hélio José Montassier pela orientação e pela oportunidade de ter desenvolvido este trabalho.

À Dra. Liana Brentano por ter-me mostrado os caminhos da virologia e pelo incentivo para o meu ingresso no mestrado. Pelo fornecimento das estirpes virais utilizadas neste trabalho e por permitir o desenvolvimento de parte do trabalho na EMBRAPA.

Ao Prof. Dr. Eurico de Arruda Neto pela orientação em relação à técnica de PCR-ELISA.

À Izolete Santos Macedo pelo auxílio no desenvolvimento inicial da técnica de PCR-ELISA.

À Poliana pelas orientações iniciais em relação à extração de RNA.

À Cintia Hiromi Okino por ter-me auxiliado nas extrações de RNA e no desenvolvimento das reações de RT-PCR.

Aos amigos do Laboratório: Aliandra, Àureo (*in memoriam*), Cibele, Fátima, Lurdinha, Patrícia Ferro, aos estagiários: Alex, Anié, Igor, Juliana, Vanessa e a todos os funcionários do Departamento de Microbiologia: de diferentes formas vocês contribuíram para que este trabalho fosse concluído.

À Patrícia (Tyta) e Celso: por demonstrarem que a generosidade é uma virtude e repartir é uma bênção.

Aos amigos Ana Rita e Marcelo: vocês me ajudaram no início da caminhada, mas é muito bom saber que continuamos amigos mesmo separados pela distância.

Aos amigos e funcionários do CNPSA / EMBRAPA por me permitirem utilizar a estrutura e equipamentos necessários durante o desenvolvimento das etapas de infecção experimental e isolamento viral. Em especial, à **Diolete Flores Irion** pela ajuda no desenvolvimento da infecção experimental e coleta de materiais e à **Tânia** pelo auxílio no isolamento viral das amostras deste experimento.

À **Merial** pela doação dos ovos embrionados SPF.

À **CAPES** pela concessão da bolsa de Mestrado (DS).

À **FAPESP** pelo financiamento deste projeto (processo número 01/14950-3R).

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
3. OBJETIVOS.....	13
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
4.1 Vírus	14
4.2 Propagação viral das estirpes de VBI em ovos embrionados SPF	15
4.3 Determinação da infectividade viral.....	16
4.4 Infecção experimental.....	16
4.5 Isolamento viral.....	17
4.6 Extração de RNA.....	18
4.7 Primers utilizados	19
4.8 RT-PCR	21
4.9 Nested-RT-PCR	22
4.10 Eletroforese em gel de agarose.....	22
4.11 RT-PCR-ELISA.....	23
4.11.1 Marcação da sonda	23
4.11.2 Hibridização em microplaca.....	24
4.11.3 Determinação do ponto de corte.....	25
4.12 Determinação da sensibilidade analítica.....	26
4.13 Determinação da especificidade analítica.....	26
5. RESULTADOS	27
5.1 Especificidade analítica (RT-PCR, Nested-PCR e RT-PCR-ELISA)	27
5.2 Sensibilidade analítica (RT-PCR, Nested-PCR e RT-PCR-ELISA).....	30
5.3 Detecção do VBI em aves infectadas experimentalmente.....	33
6. DISCUSSÃO	42
7. CONCLUSÕES	52
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1:** Representação esquemática do genoma do VBI e a localização dos primers utilizados neste estudo20
- FIGURA 2:** Avaliação da especificidade analítica da reação de RT-PCR e Nested-PCR em relação a três vírus heterólogos (A) e 05 estirpes do VBI (B)28
- FIGURA 3:** Avaliação da especificidade analítica da reação de PCR-ELISA 29
- FIGURA 4:** Avaliação da sensibilidade analítica das reações de RT-PCR, Nested-PCR e PCR-ELISA em relação a estirpe H-120 do VBI.....31
- FIGURA 5.** Desempenho da técnica de PCR-ELISA na detecção das amostras de traquéia e pulmão provenientes das aves experimentalmente infectadas, respectivamente, com as estirpes H-120 e A034 do VBI. 34
- FIGURA 6:** Detecção do VBI, através da reação de Nested-PCR, das amostras de traquéia (A) e pulmão (B) de aves experimentalmente infectadas com a estirpe H-120 do VBI 39
- FIGURA 7:** Detecção do VBI, através da reação de Nested-PCR, das amostras de traquéia (A) e pulmão (B) de aves experimentalmente infectadas com a estirpe A034 do VBI..... 40

FIGURA 8: Reação de Nested-PCR, das amostras de pulmão (A) e traquéia (B) de aves do grupo controle (não infectados com o VBI) da infecção experimental..... 41

DESENVOLVIMENTO DA TÉCNICA DE RT-PCR-ELISA PARA A DETECÇÃO DO VÍRUS DA BRONQUITE INFECCIOSA DAS AVES (VBI)

RESUMO

Um método de diagnóstico baseado na associação entre as técnicas de RT-PCR e ELISA foi desenvolvido para a detecção do vírus da bronquite infecciosa das aves (VBI). Inicialmente, a especificidade e a sensibilidade analíticas dessa técnica, bem como dos métodos de RT-PCR e Nested-RT-PCR, foram determinadas, tendo-se demonstrado, para o primeiro parâmetro, apenas a detecção do VBI, enquanto que outros vírus heterólogos aviários testados, tais como pneumovírus aviário (APV / estirpe do grupo B), vírus da doença de Newcastle (NDV / estirpe La Sota) e vírus da doença de Gumboro (GDV - estirpe Lukert), não foram detectados. Quanto à avaliação da sensibilidade analítica dos métodos empregados neste estudo foi constatado que o RT-PCR-ELISA demonstrou ser 10 vezes mais sensível do que a RT-PCR, enquanto que a reação de Nested-PCR foi 100 vezes mais sensível que a RT-PCR e 10 vezes mais sensível que o RT-PCR-ELISA. A técnica de RT-PCR-ELISA, juntamente com os outros dois métodos de biologia molecular, foram aplicadas para a detecção das estirpes H-120 e A034 do VBI, em amostras de pulmão e traquéia obtidas de aves experimentalmente infectadas com essas duas estirpes virais. Os resultados obtidos nos diferentes métodos de biologia molecular foram comparados entre si e com a técnica padrão de isolamento viral em ovos embrionados, verificando-se que o RT-PCR-ELISA revelou-se tão específico quanto as técnicas de isolamento viral e Nested-PCR, porém foi menos sensível do que esses mesmos métodos na detecção do VBI. A técnica de RT-PCR-ELISA, utilizada pela primeira vez para o VBI, demonstrou o potencial de se constituir uma alternativa viável para um diagnóstico direto mais rápido e específico do VBI.

Palavras-Chave: bronquite infecciosa das aves, diagnóstico, Nested-PCR, PCR-ELISA, RT-PCR, VBI

DEVELOPMENT OF REVERSE TRANSCRIPTION - PCR - ELISA FOR THE DETECTION OF INFECTIOUS BRONCHITIS VIRUS (IBV)

SUMMARY

A molecular biology method for the detection of avian infectious bronchitis virus (IBV) was developed combining the reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR) with the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Firstly, the analytical specificity and sensitivity of RT-PCR-ELISA, RT-PCR and Nested-RT-PCR were assessed. The specificity of these methods were confirmed since only IBV was detected, while other heterologous avian viral pathogens such as pneumovirus (Group B), Newcastle disease virus (LaSota strain) and gumboro disease virus (Lukert strain) were not detected by these techniques. The sensitivity of these methods was established, indicating that the RT-PCR-ELISA was about ten times more sensitive than conventional RT-PCR, while Nested-PCR was a hundred more sensitive than RT-PCR and ten times more sensitive than PCR-ELISA. The RT-PCR-ELISA and the two molecular biology methods were also applied for the detection of IBV strains H-120 and A034, in lung and tracheal tissue samples collected from experimentally infected chickens. The results of these different methods were also compared with the standard diagnostic technique, the virus isolation in chicken embryonated eggs, showing that RT-PCR-ELISA was as specific as virus isolation and Nested-PCR, however it was less sensitive than these methods for the IBV detection. The RT-PCR-ELISA, applied for the first time for IBV detection and direct diagnosis in tissue samples, can be potentially applied as an useful alternative for the rapid and specific diagnosis of IBV.

Keywords: avian infectious bronchitis virus, diagnosis, Nested-PCR, PCR-ELISA, RT-PCR, IBV

1. INTRODUÇÃO

A bronquite infecciosa das aves é uma doença viral, de caráter agudo, altamente infecciosa e comum em países com grandes plantéis de aves comerciais. Esta enfermidade foi descrita pela primeira vez em 1930, nos Estados Unidos, como uma doença respiratória aguda, acometendo principalmente aves jovens. A etiologia viral foi estabelecida e o patógeno foi denominado vírus da bronquite infecciosa das aves (VBI), que é um vírus cujo genoma é constituído por RNA de fita simples e polaridade positiva, classificado como membro do gênero *Coronavirus*, dentro da família *Coronaviridae*.

Os métodos convencionais para o diagnóstico do VBI são baseados no isolamento viral em ovos embrionados ou em cultura de órgão traqueal, seguido da técnica de vírus-neutralização, porém tais procedimentos são onerosos e muito demorados.

Com o advento da reação de PCR, várias metodologias foram desenvolvidas para a detecção, identificação e diferenciação do VBI. Nesse sentido, a reação de RT-PCR, isoladamente ou em conjunto com outras técnicas de biologia molecular, tais como o mapa genômico por enzimas de restrição ou o sequenciamento de nucleotídeos do genoma viral, tem sido amplamente utilizada como um meio de diagnóstico rápido, preciso e sensível nas infecções com este vírus.

A fim de aumentar a sensibilidade da técnica de RT-PCR na detecção do VBI, foi desenvolvida a reação de Nested-PCR. Porém o enorme risco de contaminação com os fragmentos de DNA amplificados de amostras teste tem tornado esta técnica mais difícil de ser aplicada e rotineiramente adotada.

Alternativamente, os produtos amplificados no PCR podem ser analisados por uma combinação do método de hibridização de ácidos nucléicos com técnicas

imunológicas semelhantes às empregadas em ensaios imunoenzimáticos. Tal metodologia, conhecida com PCR-ELISA, apresenta uma série de vantagens, tais como alta sensibilidade, especificidade e rapidez. Ainda, este método foi pioneiramente empregado no diagnóstico de doenças virais humanas e não há estudos versando sobre a montagem e a padronização desta técnica para o diagnóstico do VBI.

Diante disso, o presente estudo foi formulado com o objetivo de desenvolver o método de RT-PCR-ELISA para detectar o VBI em amostras de tecidos e fluidos biológicos de aves experimentalmente infectadas. Para tanto, estabeleceu-se a sensibilidade e a especificidade desta técnica em relação aos métodos de RT-PCR e Nested-RT-PCR, comparando o desempenho desses métodos entre si e com a técnica padrão de isolamento viral em ovos embrionados de galinha.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Segundo a Organização Internacional de Epizootias, a bronquite infecciosa (BI) é uma doença aguda e altamente contagiosa de aves, caracterizada primariamente por sintomas respiratórios (OIE, 2000). Esta enfermidade está distribuída mundialmente e várias estirpes tem sido isoladas (COOK, 1984; DARBYSHIRE, 1978; DAVELAAR, KOUWENHOVEN & BURGER, 1984; DOI et al., 1982; LOHR, 1975).

A BI foi observada pela primeira vez em 1930, no estado norte-americano de Dakota do Norte, sendo descrita por SCHALK & HAWN (1931). No Brasil, a doença foi diagnosticada inicialmente por HIPÓLITO (1957).

O vírus da bronquite infecciosa (VBI), agente etiológico desta doença, pertence a ordem *Nidovirales*, família *Coronaviridae* e ao gênero *Coronavirus* (grupo III) (CAVANAGH, 1997; CAVANAGH et al., 1994). Esse vírus possui envelope lipo-protéico, apresenta o capsídeo com simetria helicoidal e o diâmetro do vírion completo entre 90 a 200 nanômetros (nm). O genoma do VBI é composto por uma fita de RNA simples, não segmentada, com sentido positivo e 27,6 Kilobases (Kb) de comprimento (BOURSNELL et al., 1987). Três diferentes genes são responsáveis por codificar as principais proteínas estruturais deste vírus, isto é, a glicoproteína de superfície (S), a glicoproteína da matriz (M) e a proteína do nucleocapsídeo (N) (CAVANAGH, 1981; LAI & CAVANAGH, 1997; SIDDELL, WEGE & TER MEULEN, 1982; 1983; STERN & KENNEDY, 1980; STERN & SEFTON, 1982; STURMAN & HOLMES, 1983; STURMAN, HOLMES & BEHNKE, 1980).

A proteína do nucleocapsídeo (N) está intimamente relacionada com o RNA genômico e apresenta seqüências altamente conservadas, ocorrendo pequenas variações entre as várias estirpes do VBI (BOURSNELL et al., 1985; BOURSNELL et

al., 1987; CAVANAGH, 1995). Esta proteína desempenha também um importante papel na replicação viral, pois interage com a seqüência líder do RNA, facilitando a síntese de RNA mensageiro, além de combinar-se com RNA genômico viral para formar um nucleocapsídeo de simetria helicoidal (LAUDE & MASTERS, 1995).

A glicoproteína M (da membrana) tem importância no processo de recombinação natural que ocorre entre os diferentes sorotipos do VBI e é essencial para a produção das partículas virais (DI FÁBIO & ROSSINI, 2000; LAI & CAVANAGH, 1997).

A glicoproteína S é a estrutura que forma um conjunto de projeções no envoltório externo viral formando uma proeminente coroa na superfície do envelope viral e é composta de duas subunidades, S1 com 520 aminoácidos e S2 com 625 aminoácidos (CAVANAGH & NAQI, 1997). A subunidade S1 contém a maior parte dos epítomos indutores de anticorpos vírus-neutralizantes e inibidores de hemaglutinação (CAVANAGH et al., 1986; KOCH et al., 1990; PARR & COLLISON, 1993), adesão celular e especificidade sorotípica, enquanto na subunidade S2 foi encontrado apenas um epítomo envolvido na interação com anticorpos neutralizantes (CAVANAGH et al., 1992; CAVANAGH, DAVIS & MOCKETT, 1988; CAVANAGH, ELLIS & COOK, 1997; GALLAGHER, PARKER & BUCHMEIER, 1990; KOCH et al., 1990; MOCKETT, CAVANAGH & BROWN, 1984; NIESTERS et al., 1989). A mutação no gene da proteína S determina o surgimento de novas variantes e até mesmo sorotipos desse mesmo vírus, sendo que a diferenciação das estirpes do VBI fundamenta-se na identificação da região variável da proteína S (KUSTERS et al., 1987).

Há evidências de que ocorre recombinação natural entre os genomas de diferentes estirpes do VBI (JIA et al., 1995; KUSTERS et al., 1990; WANG, JUNKER & COLLISON, 1993). Dessa forma, como consequência de mutações e de recombinações gênicas, aparecem variações antigênicas e biológicas entre as diversas estirpes do VBI (COOK, 1984; DARBYSHIRE et al., 1979; DAWSON & GOUGH, 1971; HOFSTAD, 1958; HOPKINS, 1974).

Ademais, acredita-se que o sítio neutralizante mais importante e capaz de induzir, portanto, anticorpos com maior atividade vírus-neutralizante, está situado na proteína S (KANT et al., 1992), o qual é essencial no desenvolvimento da proteção

imune (IGNJATOVIC & GALLI, 1994). Experimentos de vacinação e desafio, sugerem que o grau de proteção cruzada entre as estirpes diminui na medida em que as diferenças entre suas seqüências de S1 aumentam (CAVANAGH & NAQI, 1997).

Enfim, deve ficar patente, que a existência e mesmo a geração continuada de diferentes estirpes do VBI está diretamente relacionada com a ocorrência de fenômenos de deleção, mutação e recombinação do RNA genômico viral (CAVANAGH et al., 1992; GELB, Jr, WOLFF & MORAN, 1991; KUSTERS et al., 1989; LEE & JACKWOOD, 2000). O genoma do VBI facilmente sofre mutações devido à natureza mais frágil do RNA em relação ao DNA, à necessidade de uma fita complementar de RNA e à infidelidade da RNA polimerase viral (SUTOU et al., 1988).

O VBI replica-se primeiramente junto à porta de entrada, com maior predominância no trato respiratório superior (traquéia) e inferior (pulmões) e, após a viremia, dissemina-se pelo trato reprodutivo, rins, tecido linfóide (DHINAKAR RAJ & JONES, 1997). Além disto, foi observado que a replicação também pode ocorrer no trato intestinal (DHINAKAR RAJ & JONES, 1996). O VBI já foi encontrado em amostras de esôfago, proventrículo, fígado, baço, duodeno, jejuno, tonsila cecal, cloaca, bursa de Fabrício e nas fezes (ALBASSAM, WINTERFIELD & THACKER, 1986; ALEXANDER & GOUGH, 1977; AMBALI & JONES, 1990; EL-HOUADFI et al., 1986; LUCIO & FABRICANT 1990; OWEN et al., 1991). A infecção no oviduto pode levar a queda na postura, assim como a produção de ovos defeituosos. Há estirpes do VBI que podem ser nefropatogênicas, causando quadros de nefrite aguda, urolitíase e maior mortalidade (ALBASSAM, WINTERFIELD & THACKER, 1986). Infecções secundárias, causadas por *Mycoplasma synoviae* e *Escherichia coli*, associadas a infecção pelo VBI, podem produzir, respectivamente, aerosaculite (HOPKINS & YODER, Jr, 1986) e mortalidade em aves jovens (COOK, SMITH & HUGGINS, 1986).

Aves de todas as idades são susceptíveis à infecção pelo VBI e a transmissão da infecção por esse vírus ocorre por contato direto ou indireto, com morbidade e mortalidade variando de 5 a 20% (CAVANAGH & NAQI, 1997). Em algumas circunstâncias, as aves acometidas não apresentam sintomas clínicos respiratórios, em

razão da estirpe viral envolvida, da linhagem e da idade das aves, além das condições ambientais onde tais animais encontram-se alojados.

Os prejuízos econômicos causados pela BI ocorrem principalmente devido a quedas na produção e qualidade dos ovos nas aves de postura infectadas com o VBI, mortalidade em aves jovens acometidas, diminuição no ganho de peso e na taxa de conversão alimentar dessas mesmas aves, além de perdas e condenações de carcaça devido a ocorrência de aerosaculite (CUNNINGHAM, 1970).

O VBI replica-se no citoplasma, onde 6 RNA mensageiros (A, B, C, D, E e F) são produzidos por um mecanismo de transcrição descontinuada, o qual pode favorecer uma maior geração de genomas recombinantes desse vírus (LAI et al., 1994; STERN & KENNEDY, 1980a e b). Ao penetrar na célula, o vírion codifica uma polimerase, que é usada para sintetizar uma fita de RNA negativa, a qual serve de "template" para a produção dos RNAs subgenômicos. A formação do vírion ocorre na membrana do retículo endoplasmático (RE) e não na superfície celular. Os vírions se acumulam em vesículas do RE liso, mas o mecanismo de sua liberação é desconhecido. Novas partículas virais formam-se poucas horas após a infecção e o pico máximo de formação ocorre dentro de 12h a 37°C. (LAI & CAVANAGH, 1997; LEIBOWITZ, WILHELMSSEN & BOND, 1981).

O controle da bronquite infecciosa está principalmente fundamentado em programas de vacinação dos plantéis avícolas com vacinas vivas ou inativadas. No entanto, surtos de infecção pelo VBI continuam ocorrendo em aves vacinadas, devido à baixa proteção cruzada conferida pelas estirpes vacinais em relação às variantes de campo, que constantemente estão surgindo em plantéis de aves comerciais (CAPUA et al., 1994; COOK, 1984; DAVELAAR, KOUWENHOVEN & BURGER, 1984; GELB, Jr, WOLFF & MORAN, 1991; JIA et al., 1995; KING, 1988).

Em 1973, foi descrito o isolamento de duas amostras nefropatogênicas do VBI no Brasil (HIPÓLITO, BOTTINO & PINTO, 1973) e um levantamento sorológico em frangos, realizado nas regiões do Alto do São Francisco e Metalúrgica de Minas Gerais, entre os anos de 1985 e 1986, revelou soropositividade para o VBI em 38% de 78 granjas avaliadas (JORGE, RESENDE & OLIVEIRA, 1992). Além disso, dados contidos

em relatórios de dois laboratórios de diagnóstico de Minas Gerais revelaram que a bronquite infecciosa foi a segunda doença viral mais freqüente em diagnósticos realizados entre 1987 e 1988 (SILVA, 1989). Assim, por ser o Brasil um dos maiores produtores avícolas do mundo, a bronquite infecciosa configura-se como um grande problema para a avicultura nacional (DI FÁBIO et al., 2000). O conjunto de informações acima relatado reforça a importância de serem adotados métodos de diagnóstico rápidos e sensíveis para a detecção e a identificação do VBI, a fim de serem utilizados nos programas de controle desta doença.

A técnica convencional para diagnosticar o VBI consiste no isolamento viral (IV) em ovos embrionados SPF ("*Specific Pathogen Free*") (GELB, Jr, 1989; OWEN et al., 1991) ou em culturas celulares (HOPKINS, 1974), seguido da identificação por meio da reação de soroneutralização (SN) (ARVIDSON et al., 1990; CLARKE, McFERRAN & GAY, 1972; COOK, 1984; COWEN & HITCHNER, 1975; DAWSON & GOUGH, 1971; HITCHNER, 1973). Três ou mais passagens em ovos embrionados de galinha são geralmente necessárias para o isolamento primário do VBI, o que torna tais procedimentos onerosos e demorados.

Uma outra alternativa, é o isolamento do VBI a partir da inoculação em cultura de órgão traqueal de aves, a qual se revelou uma técnica bastante sensível para essa finalidade (COOK, DARBYSHIRE & PTERES, 1976), mas também muito laboriosa e demorada. Esse método pode ser associado à reação de imunofluorescência direta em culturas de órgão traqueal, permitindo a detecção mais rápida do VBI (BHATTACHARJEE, NAYLOR & JONES, 1994).

Outros métodos diagnósticos incluem a imunofluorescência, que geralmente é realizada em células alantóides infectadas (CHUBB, 1986; LUCIO & HITCHNER, 1970), microscopia eletrônica, feita após a concentração do vírus por ultracentrifugação, os testes com anticorpos fluorescentes em membranas córion alantóides de ovos embrionados infectados (CLARKE, McFERRAN & GAY, 1972) e imunodifusão em gel de ágar (CHUBB & CUMMING, 1971). Alternativamente o VBI pode ser detectado diretamente em tecidos de aves infectadas através de imunohistoquímica (IHC) (CHEN

et al.,1996; DHINAKAR RAJ & JONES, 1996; NAKAMURA et al., 1991; YAGYU & OHTA, 1990) ou da técnica de hibridização 'in situ' (COLLISSON et al., 1990).

Os métodos sorológicos mais utilizados no diagnóstico laboratorial da BI, especialmente com o intuito de identificar as diferentes variantes do VBI, são o teste de vírus-neutralização (VN), de inibição de hemoaglutinação (HI) (BROWN & BRACEWELL, 1985; KING & HOPKINS, 1984) e ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) com anticorpos monoclonais ou policlonais (IGNJATOVIC & ASHTON, 1996; WANG, HONG & SEAK, 2002). No entanto, em alguns casos são observados problemas relacionados ao desenvolvimento de reações inespecíficas, baixa sensibilidade, subjetividade da análise dos resultados, além da impossibilidade, no caso das reações imunoenzimáticas, de discriminação entre as diferentes estirpes do VBI.

O advento da reação em cadeia de polimerase (PCR) (MULLIS & FALOONA, 1987; MULLIS et al., 1986; SAIKI et al., 1985) trouxe importantes fundamentos para a realização dos métodos de diagnóstico laboratorial de agentes infecciosos, redundando em uma melhoria significativa da sensibilidade e especificidade do diagnóstico etiológico de várias doenças infecciosas ou parasitárias.

A PCR é uma técnica de biologia molecular que permite a amplificação de fragmentos específicos do DNA presente em uma pequena quantidade de amostra. O processo utiliza-se de uma DNA-polimerase termoestável (Taq Polimerase) e de oligo-sondas (primers) específicas, as quais se ligam a determinadas regiões do genoma que delimitam um segmento genômico específico a ser amplificado. A reação se processa em três etapas básicas: (1-) desnaturação do DNA da amostra, (2-) anelamento dos primers a essa mesma molécula de ácido nucléico e (3-) extensão ou polimerização das novas moléculas do DNA a serem amplificadas. Tais fases ocorrem em diferentes temperaturas que compõem cada um dos ciclos de incubação da referida reação. Após o primeiro ciclo, a quantidade de DNA na reação é dobrada. Entre 30 e 35 ciclos, há um aumento considerável na quantidade de DNA, o qual atinge 10^5 a 10^6 cópias do DNA inicialmente presente (HOY, 1994; INNIS & GELFAND, 1990; KWOH & KWOH, 1990; OSTE, 1988).

Em adição à técnica de PCR, a transcrição reversa, seguida da reação em cadeia de polimerase (RT-PCR), tem-se revelado uma ferramenta muito útil no diagnóstico de muitos RNA-vírus, dentre eles o VBI (CAVANAGH, 1993).

LIN et al. (1991) foram os primeiros a utilizarem a reação de RT-PCR no diagnóstico do VBI, amplificando parte da região S2 de 6 isolados virais clássicos dos EUA e 9 isolados do Japão. ANDREASEN, JACKWOOD & HILT (1991) detectaram o VBI em amostras de LCA infectado com a estirpe Beaudette, a partir da região conservada do genoma do VBI, entre os genes M e N, confirmando-se a identidade dos produtos de PCR através do sequenciamento.

Em 1992, ZWAAGSTRA, VAN DER ZEIJST & KUSTERS amplificaram parte do gene N, a partir de amostras do LCA infectadas com 5 isolados da estirpe Massachusetts e 13 isolados Duth do VBI, realizando o sequenciamento a fim de identificar a estirpe viral.

Foram também utilizados métodos de hibridização dos produtos gerados por RT-PCR em membranas de nitocelulose, através da utilização de sondas não radioativas, permitindo a detecção do genoma do VBI (JACKWOOD, KWON & HILT, 1992; KWON et al., 1993).

A técnica de RT-PCR associada com a análise de fragmentos genômicos gerados por enzimas de restrição, método este denominada RFLP ("restriction fragmente length polymorphism analysis") permitiram a identificação de diferentes sorotipos de várias estirpes do VBI (JACKWOOD, YOUSEF & HILT, 1997; KWON, JACKWOOD & GELB, Jr, 1993).

ADZAR et al. (1996) definiram uma série de primers "universais", capazes de detectar uma gama de estirpes do VBI, provenientes dos Estados Unidos, Austrália, Europa e Japão, isoladas em um período de 50 anos.

HANDBERG et al. (1999) realizaram um estudo, aplicando a técnica de RT-PCR, com primers específicos para os genes N e S do VBI e demonstraram que esse método foi capaz de fazer a detecção e diferenciação de estirpes do VBI, presentes em amostras de LCA e de traquéia provenientes de aves infectadas experimentalmente.

Com a finalidade de se obter uma melhor diferenciação de estirpes do VBI e um aumento da sensibilidade e especificidade da técnica de RT-PCR para o diagnóstico desse vírus, foi desenvolvida e aplicada com sucesso a reação de RT-PCR multiplex (CAPUA et al., 1999; CAVANAGH et al., 1999; LIU et al., 2003).

FALCONE et al. (1997), visando aumentar ainda mais a sensibilidade da reação de RT-PCR, investigaram o desempenho do método de Nested-RT-PCR aplicado à detecção direta do VBI em tecidos de aves naturalmente infectadas. A técnica de Nested-PCR mostrou-se, nesse estudo, eficiente em promover a redução ou a eliminação de produtos indesejáveis e, ao mesmo tempo, foi capaz de proporcionar um aumento drástico na sensibilidade da reação de PCR. O princípio dessa metodologia consiste na realização de um conjunto adicional de ciclos térmicos para a re-amplificação do DNA proveniente da reação de PCR, utilizando primers complementares a seqüência interna do primeiro par de primers utilizados. Desta forma, apenas o produto legítimo deverá ser amplificado. Este procedimento é utilizado nas circunstâncias em que o produto desejado encontra-se abaixo do nível de detecção pela técnica de eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídio ou quando os resultados revelam a presença de produtos amplificados indesejáveis (ROUX, 1995).

Finalizando, RT-PCR tem sido também empregada em conjunto com as técnicas de clonagem e sequenciamento de nucleotídeos dos genes mais relevantes do VBI, de forma a se obter uma caracterização mais acurada da variação genética e fenotípica que ocorre nas estirpes variantes do VBI (ADZAR et al., 1997; BOURSNEILL, BINNS & BROWN, 1985; BOURSNEILL et al., 1985; BOURSNEILL et al., 1987; CAPUA et al., 1999; KEELER et al., 1998; KOTTIER, CAVANAGH & BRITTON, 1995; LEE & JACKWOOD, 2000; LIU et al., 2003; PENZES et al., 1994; SAPATS et al., 1996; SUTOU et al., 1988).

Em geral, a detecção do produto amplificado pela técnica de PCR é feita por eletroforese em gel corado com brometo de etídio, o que permite a visualização, no transiluminador UV, de bandas correspondentes ao tamanho do fragmento genômico amplificado esperado (LANDGRAF, RECKMANN & PINGOUD, 1991). As desvantagens

deste método se referem principalmente à demora e à limitação do número de amostras a serem analisadas, além do inconveniente de tal metodologia requerer a manipulação de agentes carcinogênicos (corantes, tais como o brometo de etídio). Assim, a introdução da técnica de RT-PCR-ELISA poderia oferecer algumas vantagens sobretudo por contornar alguns desses fatores limitantes observados na execução da técnica de RT-PCR convencional na rotina de diagnóstico virológico (KHO et al., 2000; VESANEN et al., 1996).

Por outro lado, os produtos de PCR obtidos após a utilização de primers biotinizados podem ser quantitativamente analisados por técnicas imunológicas, não necessitando de separação por eletroforese ou da hibridização sobre membranas com sondas radioativas (LANDGRAF, RECKMANN & PINGOUD, 1991). Esta técnica envolve, primeiramente, a amplificação do DNA viral da amostra utilizando-se um par de primers, no qual um deles é marcado com biotina. Em seguida, a seqüência genômica amplificada do vírus (amplicom) é adsorvida às cavidades da microplaca revestidas com estreptavidina e, posteriormente, hibridizada com uma sonda oligonucleotídica marcada com digoxigenina. A detecção colorimétrica envolve um anticorpo monoclonal anti-digoxigenina conjugado a uma enzima como a peroxidase ou a fosfatase alcalina, sendo a reação, ao final, revelada após a adição de uma mistura de substrato enzimático-cromogênico (VESANEN et al., 1996).

Tal metodologia, conhecida como PCR-ELISA ou ELOSA ("Enzyme-linked-oligosorbent-assay") foi pioneiramente empregada no diagnóstico de doenças virais humanas (ARRUDA et al., 1997; BLOMQUIST et al., 1999; LANDGRAF, RECKMANN & PINGOUD, 1991; VESANEN et al., 1996). Em medicina veterinária, esse procedimento foi usado no diagnóstico do vírus da língua azul (KATZ et al., 1993), do vírus da febre aftosa (ALEXANDERSEN et al., 2000) e do vírus da doença de Newcastle (KHO et al., 2000). Esse método revelou ser altamente sensível, específico, rápido e apropriado para ser mais facilmente adaptado à rotina de diagnóstico laboratorial de tais vírus.

Em vista do exposto acima e, particularmente, em razão da inexistência de estudos versando sobre a montagem e a padronização da técnica de RT-PCR-ELISA para o diagnóstico do VBI, confirma-se como bastante justificável e importante a

condução desta investigação, a qual tem o propósito de desenvolver novos métodos de diagnóstico laboratorial desse vírus e comparar a metodologia do RT-PCR-ELISA com as atuais técnicas de biologia molecular, que já são rotineiramente empregadas no diagnóstico laboratorial do VBI, isto é, a RT-PCR e o Nested-RT-PCR, além da técnica convencional de isolamento viral em ovos embrionados.

3. OBJETIVOS

3.1 Desenvolver o método de RT-PCR-ELISA para a detecção do VBI em amostras de tecidos e fluidos biológicos (LCA) de aves experimentalmente infectadas;

3.2 Determinar a sensibilidade e a especificidade analítica dessa técnica em relação aos métodos de RT-PCR e Nested-RT-PCR;

3.3 Comparar o desempenho desses métodos entre si e com a técnica padrão de isolamento viral em ovos embrionados.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Vírus

A estirpe H-120 do VBI, proveniente do Laboratório Merial (Paulínea - SP), sob a forma liofilizada, foi diluída em 2,0 ml de água ultrapura e posteriormente inoculada em ovos embrionados SPF ("specific pathogen free"). Outras 4 estirpes do VBI foram empregadas neste estudo, sendo 2 estirpes de referência (M-41 e Arkansas) e 2 isolados de campo (A034 e UEL236). Todas essas estirpes foram obtidas do Centro Nacional de Pesquisa em Suínos e Aves da EMBRAPA (Concórdia - SC).

Além dessas estirpes, foram incluídos três vírus aviários não relacionados ao VBI, os quais foram utilizados na avaliação da especificidade das técnicas de RT-PCR, Nested-RT-PCR e de RT-PCR-ELISA (item 4.13). Estes vírus, provenientes de vacinas "vivas" atenuadas e liofilizadas, foram o pneumovírus aviário (APV, Merial, EUA, grupo B), o vírus da doença de Newcastle (NDV, Merial, Brasil, estirpe LaSota) e o vírus da doença de Gumboro (GDV, Merial, Brasil, estirpe Lukert).

4.2 Propagação viral das estirpes de VBI em ovos embrionados SPF

Esta técnica foi realizada com base na descrição de OWEN et al. (1991), com a introdução de algumas alterações. Cada estirpe viral foi inoculada em ovos SPF com 9 a 11 dias de incubação sendo, neste processo, submetidas a 3 passagens sucessivas.

Em cada passagem, foram utilizados 25 ovos embrionados por amostra, sendo 22 ovos destinados à obtenção de maior massa viral e três ao controle da infecção pelo VBI. A inoculação foi feita na cavidade alantóide, administrando-se um volume de 200 µl/ovo. Após 24 horas de inoculação, os ovos embrionados foram avaliados, sendo que a mortalidade que ocorreu neste período foi considerada inespecífica. Decorridas 36 horas, os ovos foram retirados da incubadora, colocados sob refrigeração a 4°C e o líquido cório-alantóide (LCA) foi colhido, tendo sido distribuído em alíquotas de 1,5 ml e estocado a -70°C. A mortalidade embrionária dos três ovos (controle) foi avaliada diariamente, sendo que os embriões mortos foram classificados como positivos ou negativos, respectivamente, de acordo com a presença ou a ausência de lesões características do VBI no embrião de galinha (nanismo, enrolamento e/ou hemorragia), mediante a comparação com os embriões do grupo controle negativo da infecção (10 ovos SPF que não foram inoculados). Ao final do sétimo dia pós-inoculação, todos os ovos foram abertos e os embriões submetidos à mesma pesquisa de lesões características descritas anteriormente.

4.3 Determinação da infectividade viral

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

4.4 Infecção experimental

Foram utilizados três grupos, sendo cada um deles constituído por 42 aves SPF, da linhagem white leghorn (SPAFAS). As aves foram alojadas em isoladores separados com pressão positiva e com fornecimento de ar purificado por filtração absoluta.

Aos 14 dias de idade, as aves de cada um dos dois primeiros grupos foram inoculadas, respectivamente, com as estirpes H-120 e A034 do VBI. O primeiro grupo foi infectado com uma suspensão da estirpe H-120 do VBI, contendo 10^7 DIE_{50%}/ml, através da inoculação de duas gotas via ocular e duas gotas via intranasal. As aves do segundo grupo foram inoculadas pela mesma via (óculo-nasal) com uma suspensão da estirpe A034 do VBI, contendo 10^7 DIE_{50%}/ml. O terceiro grupo não foi infectado, permanecendo como controle da infecção experimental.

Decorridos intervalos de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 17 e 20 dias pós-inoculação (dpi), três aves de cada grupo foram selecionadas ao acaso e sacrificadas. Amostras de traquéia e pulmões foram colhidas das aves de cada um dos grupos, sendo a seguir reunidas em dois pools (traquéia e pulmão)/intervalo pós-infecção analisado (dias-dpi), sendo então armazenadas a -70°C até o momento de serem processadas nas técnicas de isolamento viral, e posteriormente a extração de RNA genômico para ser aplicado nos métodos de RT-PCR, Nested-PCR e PCR-ELISA.

4.5 Isolamento viral

O isolamento viral foi realizado consoante com a técnica recomendada por OWEN et al. (1991), com algumas modificações que a seguir são explanadas. As amostras foram descongeladas, maceradas e pulverizadas em nitrogênio líquido, sendo ressuspensas, a 20% (p/v), em meio Eagle (Gibco BRL, EUA) contendo antibióticos (200 UI/ml de penicilina, 50 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomicina e 50 UI/ml de micostatina). A suspensão tecidual foi inicialmente clarificada a 5000xg por 5 minutos, a 4°C e o sobrenadante coletado foi armazenado a -70°C até o momento da inoculação em ovos embrionados SPF. As suspensões teciduais suspeitas de conterem vírus foram inoculadas na cavidade alantóide de ovos embrionados, com 9 a 11 dias de incubação. A primeira passagem foi realizada inoculando-se 200 $\mu\text{l/ovo}$ da suspensão anteriormente preparada, sendo utilizados 5 ovos/pool de órgãos. No quarto dia pós-inoculação, o líquido cório-alantóide (LCA) de 3 ovos de cada grupo foi coletado e armazenado a -70°C , para ser utilizado na segunda passagem em ovos. Foram realizadas mais duas passagens nas mesmas condições descritas acima.

A mortalidade dos embriões infectados foi avaliada diariamente, sendo que os embriões mortos foram classificados como positivos ou negativos, conforme a presença ou a ausência de lesões características do VBI no embrião de galinha (nanismo, enrolamento e/ou hemorragia), mediante a comparação com os embriões do grupo

controle (sem infecção). Ao final do sétimo dia pós-inoculação, todos os ovos foram abertos e os embriões foram submetidos à mesma pesquisa de lesões características relatadas anteriormente.

4.6 Extração de RNA

A extração de RNA foi realizada através da utilização de TRIZOL Reagent (Gibco BRL, EUA) para amostras de tecido e TRIZOL LS Reagent (Gibco, BRL, EUA) para amostras de LCA, conforme as especificações do fabricante.

Resumidamente, as amostras de tecido (100-200 mg) foram maceradas juntamente com 1000 µl de TRIZOL Reagent, utilizando-se um micropistilo. Para as amostras de LCA, a proporção de 1:1 foi estabelecida, ou seja, cerca de 500 µl de TRIZOL LS Reagent foram adicionados a 500 µl de LCA. Em seguida, as amostras foram homogeneizadas por 15 segundos no vortex, sendo incubadas por 5 minutos à temperatura ambiente (TA). Acrescentou-se 200 µl de clorofórmio, agitando-se manualmente as amostras por 15 segundos. Após um período de incubação de 3 minutos à TA, as amostras foram centrifugadas a 12000g, por 15 minutos a 4°C, sendo que, aproximadamente, 500 µl do sobrenadante foi coletado e transferido para outro microtubo (1,5 ml). As amostras de RNA foram precipitadas em 500 µl de isopropanol, após Incubação por 10 minutos, a TA e centrifugação por 12000 g, por 10 minutos a 4°C. O isopropanol foi descartado e as amostras foram lavadas em 1000 µl de etanol (70%) e secas à temperatura ambiente. Em seguida, os precipitados foram ressuspensos em 12 µl (amostras de LCA) ou 50 µl (amostras de tecido) de água tratada com DEPC (0,1%), incubando-se a 60°C por 10 minutos, antes de serem submetidos à reação de transcrição reversa.

4.7 Primers utilizados

As seqüências de nucleotídeos e a localização dos primers utilizados neste estudo, sobre o gene N do VBI, encontram-se na **Tabela 1**. A representação esquemática do genoma do VBI com a localização destes primers encontram-se na **Figura 1**.

TABELA 1 – Seqüência e localização dos primers utilizados neste estudo.

Seqüência dos Primers (5'- 3')	Posição ^a	Produto (pb)	Referência
IBVN1 5' ACCCTTACCAGCAACCC 3' (AS)	445-461		
IBVN2 5' GTCTTGTCCTCCGCGTGTA 3' (S) ^b	24-40	438	ADZAR et al., 1996
IBV3 5' GCCCCAGCTCCAGTCAT 3' (S)	135-151		
IBV4 5' CCAAGCATCTGGGACTGGT 3' (AS) ^c	356-374	240	FALCONE et al., 1997

^a localização dos primers em relação ao genoma do clone C5.322, do cDNA da estirpe Beaudette do VBI (BOURNELL et al., 1985).

^b marcado com biotina na extremidade 5'

^c marcado com digoxigenina na extremidade 3' (sonda de hibridização utilizada no PCR-ELISA)

S - sense

AS - anti-sense

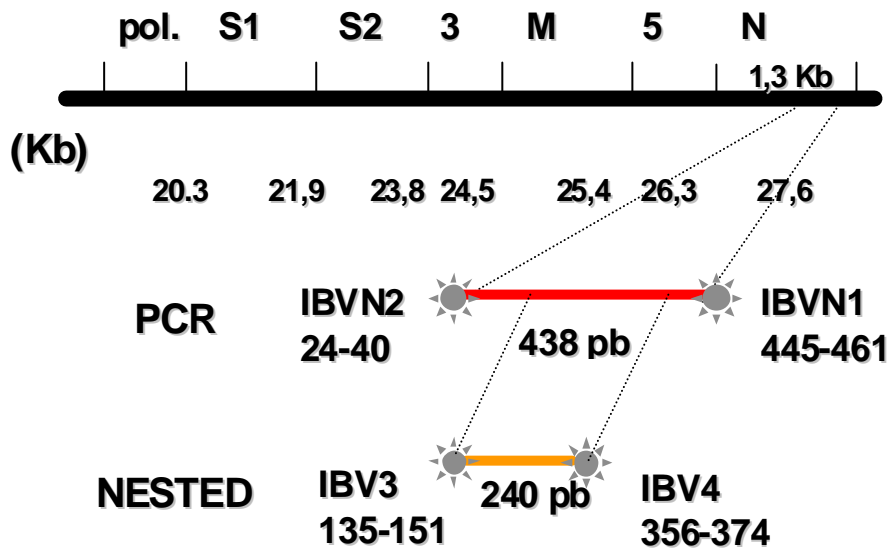


FIGURA 1: Representação esquemática do genoma do VBI e a localização dos primers utilizados neste estudo.

4.8 RT-PCR

Os ensaios de transcrição reversa foram conduzidos no termociclador Techne Progene (Techne Incorporated, Duxford, Cambridge, Reino Unido) incubando-se a 65°C por 5 minutos a mistura inicial de reação constituída por 5 µl do RNA extraído, dNTP (0,5 mM), 0,25µg de Oligo dT₁₂₋₁₈ (Invitrogen, EUA), água-DEPC (0,1%) em quantidade suficiente para completar um volume final de 10 µl. Em seguida, acrescentou-se o tampão 1x da enzima Transcriptase Reversa [Tris-HCl (50 mM, pH 8.3), KCl (75 mM), MgCl₂ (3 mM)], DTT (10 mM), 33 U de RNAGuard (Amersham Pharmacia Biotech, EUA) e incubou-se a reação a 42°C por 2 minutos. A seguir, foram acrescentadas 50 U da enzima transcriptase reversa SuperScript™II Rnase H⁻ (murine Moloney leukemia vírus) (Invitrogen, EUA), incubando-se a reação a 42°C por 50 minutos e, ao final, a 70°C por 15 minutos. O volume final da reação foi de 20 µl.

Nas reações de PCR, foi utilizado um volume de 2 µl de cDNA proveniente da reação de RT, ao qual acrescentou-se 0,5 x do tampão da Taq DNA polimerase [Tris-HCl (10 mM pH 8.4), KCl (25 mM)], dNTP (0,5 mM), 20 µM dos primers IBVN1 e IBVN2, cloreto de magnésio (1,5 mM) e 2,0 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen, EUA), completando-se com água para um volume final de 50 µl. O perfil térmico de incubação dessa reação foi constituído por 1 ciclo de 95°C por 5 minutos, seguido de mais 1 ciclo de 70°C por 2 minutos e de mais 35 ciclos constituídos por desnaturação de 94°C por 1 minuto, anelamento de 46°C por 1 minuto e extensão de 72°C por 2 minutos. Após estes ciclos, a extensão final foi realizada a 72°C por 10 minutos.

4.9 Nested-RT-PCR

As reações de Nested-PCR foram realizadas nas mesmas condições descritas para a reação de PCR, exceto que ela foi executada usando-se um conjunto de 25 ciclos constituídos por desnaturação de 95°C por 1 minuto, anelamento de 49°C por 2 minutos e extensão de 72°C por 3 minutos, utilizando o par de primers internos previamente descritos por FALCONE et al. (1997).

4.10 Eletroforese em gel de agarose

Para a análise dos resultados das reações de RT-PCR e de Nested-RT-PCR, foram adicionados 2 µl de tampão de diluição da amostra [0,05% (p/v) de azul de bromofenol, 40% sacarose (p/v), Tris-HCl (10mM, pH 7.8), EDTA (1M, pH 8.0)] em 20 µl do produto amplificado, o qual foi analisado em um gel de agarose (1%), usando-se o tampão de corrida TBE 0,5x [Tris (0,045 M), Ácido Bórico (0,045 M) e EDTA (0,001 M, pH 8,0)] por cerca de uma hora e meia a 100 V e, revelando-se, ao final da eletroforese, as bandas referentes ao DNA obtido, que foram coradas com brometo de etídio (0,5 µg/µl). A migração desses fragmentos de DNA foi comparada com a de um padrão de peso molecular de DNA de 100 bp. O fragmento de DNA amplificado foi visualizado em um transiluminador de UV (Syngene, Cambridge, Reino Unido), e os géis foram, a seguir, fotodocumentados através da utilização de uma câmara digital (Synoptics) e do software Gene Link (Syngene, Cambridge, Reino Unido).

4.11 RT-PCR-ELISA

4.11.1 Marcação da sonda

A sonda de oligonucleotídeo (primer IBV4 – anti-sense) foi marcada na extremidade 3' com digoxigenina-11-dUTP (Roche, Alemanha), utilizando-se a enzima 3' terminal desoxinucleotidil transferase (Roche, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante. Em resumo, foram misturados 100 pmol de oligonucleotídeo (IBV4), tampão 1x da enzima [cacodilato de potássio (200 mM), Tris-HCl (25 mM) e albumina sérica bovina (0,25 mg/ml, pH 6.6 a 25°C)], CoCl_2 (1,5 mM) e digoxigenina-11-dUTP (0,25 mM) e 50 U da enzima 3' terminal desoxinucleotidil transferase, em um volume final de 20 μl . A mistura foi incubada a 37°C por 2 horas, sendo que a reação foi interrompida pela adição de 1 μl de EDTA (200 mM) a 4°C. Os nucleotídeos marcados não incorporados à sonda foram removidos pela utilização da coluna MicroSpinTM G-25 (Amersham Biosciences, EUA), conforme as recomendações do fabricante. Resumidamente, acrescentou-se 30 μl de TE [Tris HCl (10 mM, pH 8.0) e EDTA(1mM)] à sonda, aplicando-a no centro da coluna. Em seguida, a coluna foi centrifugada por 2 minutos a 735 g, com a tampa semi aberta, afim de filtrar a sonda. A coluna foi então descartada e acrescentou-se 50 μL de TE à sonda filtrada, ajustando-se o volume final para 100 μL . A sonda foi armazenada a -20°C por tempo indeterminado.

4.11.2 Hibridização em microplaca

A reação de hibridização do produto de PCR biotilado foi realizada em microplacas, conforme descrito por VENASEN et al. (1996), com a introdução de algumas modificações. Resumidamente, 10 µl do produto de PCR biotilado foram aplicados nas cavidades da microplaca de poliestireno revestida com estreptavidina (Reacti-Bind™ Streptavidin Coated clear Strip Plate with Blocker™ BSA – Pierce, EUA) juntamente com 40 µl de tampão de ligação [Tris-HCl (25 mM, pH 8.2), NaCl (125 mM), EDTA (5 mM), 5x de Denhardt's (1x Denhardt's = 0,2% de soro albumina bovina (BSA), 0,2% de Ficoll, 0,2% de polivinil-pirrolidona) e 0,1% de Tween 20]. As microplacas foram incubadas por 30 min à temperatura ambiente, sob agitação a 150 rpm, para que os produtos de PCR biotilado se combinassem à estreptavidina presente na superfície das cavidades das microplacas. Para a desnaturação da fita-dupla do produto de PCR, 50 µl de tampão de desnaturação [NaOH (166 mM), NaCl (500 mM)] foram adicionados e a reação incubada por 1 minuto à temperatura ambiente. As fitas de DNA não ligadas especificamente à estreptavidina foram eliminadas, através da lavagem das cavidades da microplaca por 3 vezes, com 200 µl da solução de lavagem [Tris-HCl (20 mM, pH 8.2), NaCl (125 mM), MgCl₂ (20 mM), Tween 20 (3%)].

A hibridização ocorreu após a adição de 50 µl de solução de hibridização {1x SSC [NaCl (150 mM), citrato de sódio (15 mM)], Denhardt's (1x), SDS (0,2%) e 0.25 pmol de sonda (primer IBV4) marcada com digoxigenina}. As microplacas foram incubadas a 45°C por 30 minutos, sob agitação a 150 rpm. Terminada a etapa da hibridização, as cavidades da microplaca foram lavadas 6 vezes com 200 µl de SSC (0,01 x) Tween 20 (0,3%), sendo, a seguir, bloqueadas com 200 µl de PBS –Tween 20 (0,1%) acrescido de 5% de soro fetal bovino e 1% de leite em pó desnatado e incubadas a 37°C por 30 minutos.

Após nova lavagem das microplacas com 200µl de PBS-Tween 20 (0,1%), fez-se a adição de anticorpo anti-digoxigenina, conjugado com a peroxidase (Roche, Alemanha), na concentração de 150 mU/ 50 µl de PBS-Tween 20 (0,1%) acrescido de

1% de soro fetal bovino, sendo a microplaca incubada por 30 minutos à temperatura ambiente, sob agitação a 150 rpm e, devidamente protegida da luz.

Após novo ciclo de lavagens das microplacas, por 4 vezes com 200 μ l de PBS-Tween 20 (0,1%), foram acrescentados 50 μ l de solução substrato-cromógeno. O cromógeno utilizado foi constituído por 3,3',5,5' di-hidro-cloro-tetra-metil-benzidina (TMB) (Sigma, EUA), na concentração de 0,1 mg/ml de tampão citrato-fosfato [citrato-fosfato (0,05M, pH 5.0)], contendo 0,006% de H₂O₂. Após um período de incubação por 3 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, a reação de degradação enzimática do substrato foi bloqueada pela adição de 50 μ l/cavidade de H₂SO₄ (1M), sendo, ao final, as densidades ópticas (DO) obtidas, mensuradas em leitor de microplaca a 450 nm (Bio-Rad, Modelo-550, USA).

4.11.3 Determinação do ponto de corte

Os resultados foram expressos em valores de DO apresentando variações entre o valor mínimo de 0,054 e o máximo de 1,028. O menor valor (0,054) correspondeu ao branco da reação (somente substrato) na cavidade da microplaca revestida com estreptavidina, ou seja, a reação na qual não foi acrescentado nenhum produto de PCR biotilado. O ponto de corte foi definido como a média dos controles negativos, para cada tipo de órgão/tecido separadamente, mais três vezes o desvio padrão das leituras obtidas destes controles. Os valores de DO que foram menores que aquele obtido pelo ponto de corte foram considerados negativos.

4.12 Determinação da sensibilidade analítica

A sensibilidade analítica das reações foi avaliada a partir do cDNA da estirpe H-120, obtido após a transcrição reversa do RNA extraído do LCA infectado com esse vírus. Para tanto, o cDNA obtido foi submetido a diluições seriadas de razão constante igual a 10 (10^{-1} a 10^{-10}), as quais foram a seguir processados pelas técnicas de PCR, Nested-PCR e PCR-ELISA.

4.13 Determinação da especificidade analítica

A especificidade analítica das técnicas foi avaliada, testando-se, em princípio, um painel de 5 estirpes do VBI, incluindo 2 isolados de campo (A034, UEL 236) e 3 estirpes de referência (Arkansas, M-41 e H-120) que foram propagadas em ovos embrionados SPF. Além dessas estirpes do VBI, foram incluídos três vírus aviários não relacionados ao VBI e que foram obtidos a partir de amostras virais provenientes de vacinas “vivas” atenuadas como, o pneumovírus aviário (APV, Merial, EUA, grupo B), o vírus da doença de Newcastle (NDV, Merial, Brasil, estirpe LaSota) e o vírus da doença de Gumboro (GDV, Merial, Brasil, estirpe Lukert).

5. RESULTADOS

5.1 Especificidade analítica (RT-PCR, Nested-PCR e RT-PCR-ELISA)

A especificidade dos primers utilizados neste estudo foi comprovada pelos resultados obtidos na análise de patógenos virais heterólogos nas técnicas de RT-PCR, Nested-PCR e PCR-ELISA, os quais demonstraram a detecção de fragmento genômico específico do VBI somente nas amostras provenientes do RNA extraído a partir do LCA de ovos embrionados infectados com qualquer uma das 5 estirpes desse vírus (M-41, Arkansas, H-120, A034 e UEL 236). Por outro lado, não houve detecção de produto genômico amplificado para os vírus heterólogos testados (APV, NDV e GDV). Os resultados da especificidade analítica das reações encontram-se na **Figura 2** (reação de RT-PCR e Nested-PCR) e na **Figura 3** (reação de PCR-ELISA).

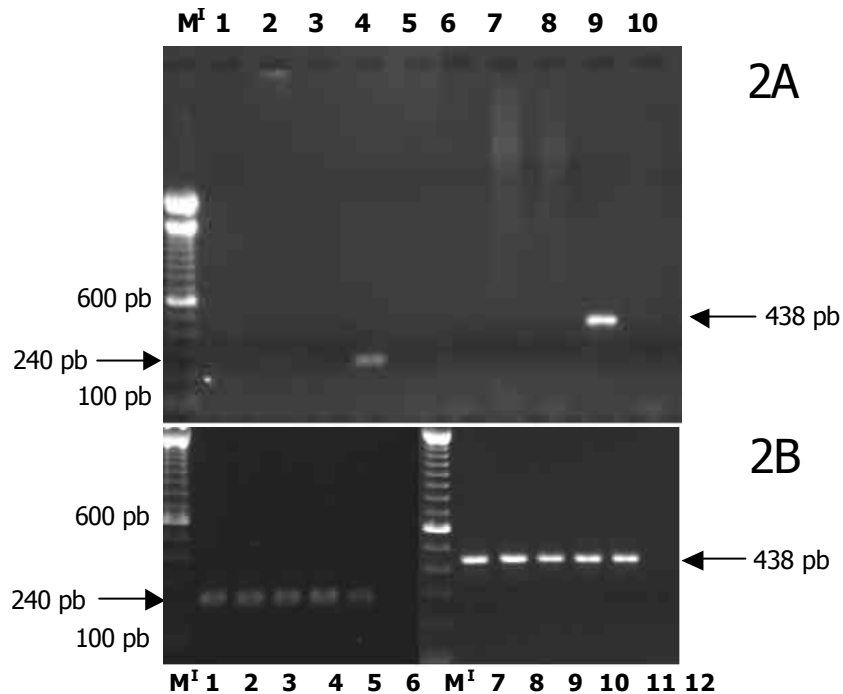


FIGURA 2. Avaliação da especificidade analítica da reação de RT-PCR e Nested-PCR em relação a três vírus heterólogos (A) e 05 estirpes do VBI (B). A. Vírus heterólogos. Legenda: Canaletas 1-4 e 6-9: pneumovírus aviário, Newcastle (LaSota), Gumboro e VBI (H-120) submetidas a Nested-PCR (1-4) e RT-PCR (6-9). Canaletas 5 e 10: controles negativos. B. Estirpes do VBI. Legenda: Canaletas 1-5 e 7-11: estirpes A034, UEL 236, Arkansas, M-41 e H-120 do VBI submetidas a Nested-PCR (1-5) e RT-PCR (7-11). Canaletas 6 e 12: controles negativos. Canaleta M: Marcador de peso molecular (100 pb - Invitrogen, EUA). Condições da eletroforese: 20 μ l de produto de PCR, gel de agarose (1%), corado com brometo de etídeo, 100 V por 1,5 h.

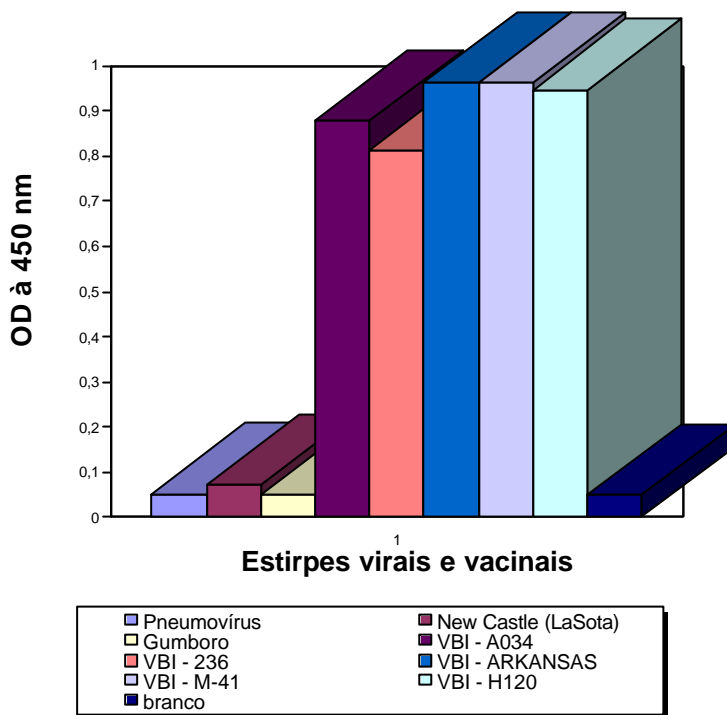


FIGURA 3. Avaliação da especificidade analítica da reação de PCR-ELISA. Um total de 05 estirpes do VBI (sendo 02 de campo e 03 de referência), além de três vírus heterólogos (pneumovírus, Newcastle e Gumboro) foram testados. Os vírus heterólogos foram PCR-ELISA negativos, enquanto que todas as estirpes do VBI testadas foram positivas. Na reação de PCR-ELISA foram utilizados os primers IBVN1 e IBVN2 (biotinilado). A sonda (IBV4) foi marcada com digoxigenina.

5.2 Sensibilidade analítica (RT-PCR, Nested-PCR e RT-PCR-ELISA)

A sensibilidade analítica entre as técnicas de biologia molecular empregadas no presente estudo foi também estabelecida, evidenciando-se que o produto amplificado pela técnica de RT-PCR foi detectado até a diluição de 10^{-2} , o qual se apresentou após a separação eletroforética no gel de agarose corado com brometo de etídio, sob a forma de bandas de 438 pb (**Figura 4a**). Já, a reação de Nested-PCR permitiu a detecção, depois de idêntica separação eletroforética, de produtos amplificados com 240 pb até a diluição de 10^{-4} (**Figura 4b**), mostrando-se, dessa forma, cerca de 100 vezes mais sensível do que o RT-PCR. Por outro lado, a técnica de PCR-ELISA detectou o produto amplificado do VBI, até a diluição de 10^{-3} (**Figuras 4c e d**), revelando que esse método é 10 vezes mais sensível do que a técnica convencional de RT-PCR, porém ele foi 10 vezes menos sensível do que o Nested-RT-PCR.

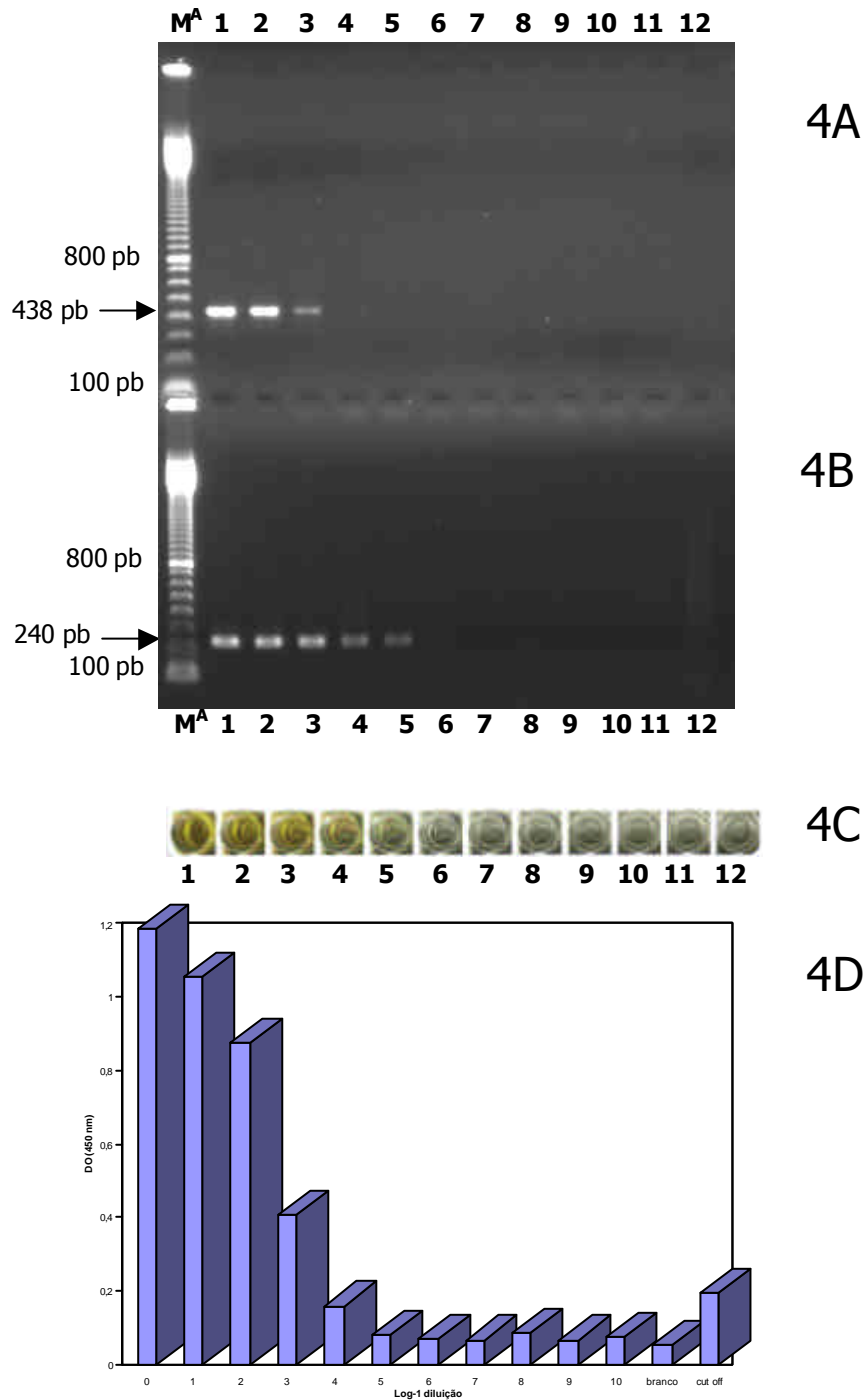


FIGURA 4. Avaliação da sensibilidade analítica das reações de RT-PCR, Nested-PCR e PCR-ELISA em relação a estirpe H-120 do VBI. O cDNA foi submetido a diluições

seriadas de razão 10 (de 10^{-1} a 10^{-10}) e então processado pelas técnicas de PCR (A), Nested-PCR (B) e PCR-ELISA (C e D). Legenda M^{Λ} : Marcador de peso molecular (100 pb - Amersham Biosciences, EUA). Canaleta 1: produto não diluído. Canaletas 2-11: produto amplificado a partir das diluições de razão 10 (canaleta 2, diluição de 10^{-1} até a canaleta 11, diluição de 10^{-10}). Canaleta 12: controle negativo. Condições da eletroforese: 20 μ l de produto de PCR, gel de agarose (1%), corado com brometo de etídeo, 100 V por 1,5 h.

5.3 Detecção do VBI em aves infectadas experimentalmente

O ponto de corte da reação de PCR-ELISA foi calculado, separadamente, para as análises de amostras de traquéia e pulmão, tomando como base a média dos valores das densidades ópticas (DO_{450}) obtidas para as amostras de tecidos análogos das aves do grupo controle (não infectado), acrescida de três vezes o valor do desvio-padrão da DO média obtida nessas amostras controle (BLOMQUIST et al., 1999; KHO et al., 2000). O valor da DO correspondente ao ponto de corte para as amostras de pulmão foi igual a 0,297, enquanto para as amostras de traquéia foi 0,193. Portanto, as amostras com DOs maiores ou iguais a 0,297, para o pulmão e a 0,193, para a traquéia, foram consideradas positivas. A **Figura 5** mostra os perfis de reatividades da técnica de PCR-ELISA na detecção do VBI em amostras de traquéia e pulmão, provenientes das aves infectadas experimentalmente com as estirpes H-120 e A034 do VBI, nos diferentes intervalos de tempo pós-infecção. O desempenho da técnica de RT-PCR-ELISA foi melhor para a detecção desse vírus nas amostras do grupo H-120 do que naquelas provenientes de aves infectadas com a estirpe A034 e, ainda, os melhores resultados foram obtidos pelas amostras de pulmão do grupo H-120 do que para as amostras de traquéia.

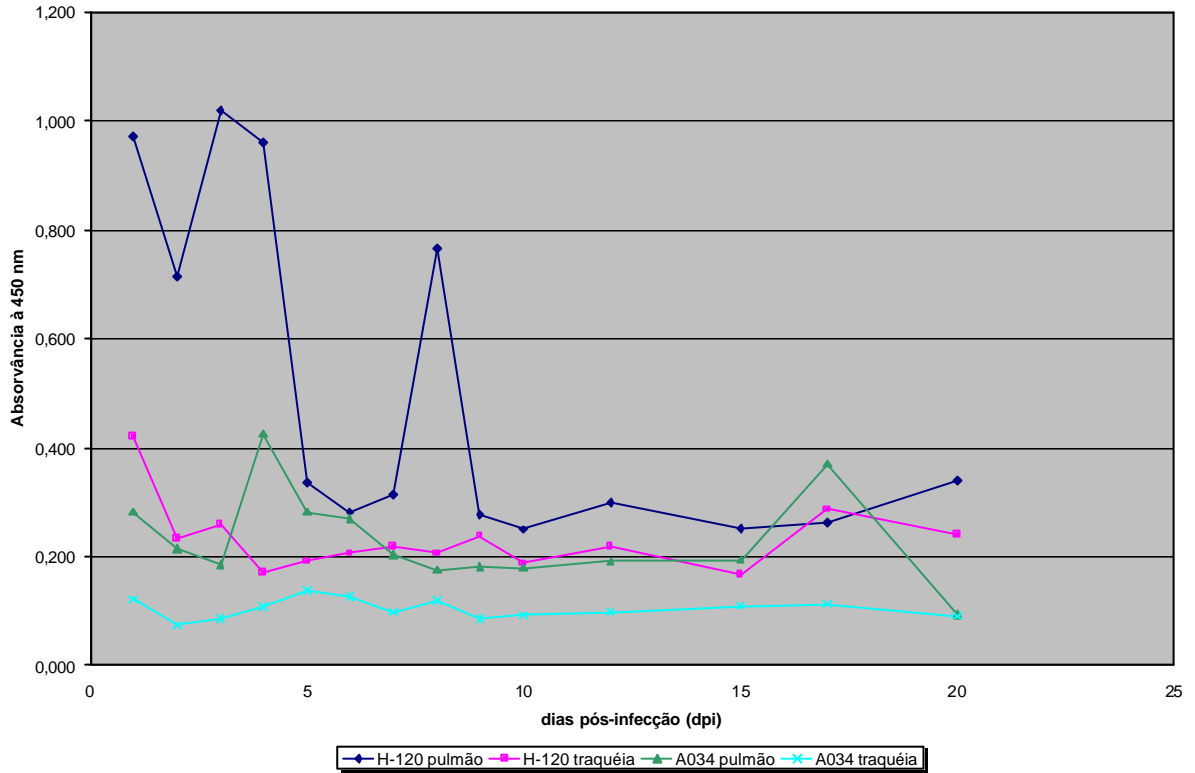


FIGURA 5. Desempenho da técnica de PCR-ELISA na detecção das amostras de traquéia e pulmão provenientes das aves experimentalmente infectadas, respectivamente, com as estirpes H-120 e A034 do VBI.

Os resultados obtidos com as amostras de pulmão e traquéia coletadas durante a infecção experimental e processadas através das técnicas Nested-PCR e PCR-ELISA encontram-se nas **Tabelas 2 e 3**. Esses resultados foram comparados com aqueles observados no método convencional de diagnóstico laboratorial do VBI, que é a técnica de isolamento viral em ovos embrionados de galinha. Essa última técnica de diagnóstico revelou-se eficiente para detectar o VBI nas amostras de traquéia e pulmão infectadas, respectivamente, com as estirpe H-120 e A034 do VBI. Nessas amostras, foi recuperado vírus na maioria dos intervalos pós-infecção testados entre o primeiro e o nono dia pós-infecção, com exceção da amostra de pulmão colhida no sétimo dia pós-infecção do grupo A034.

A análise dos produtos amplificados, obtidos pela reação de RT-PCR e submetidos à eletroforese em gel de agarose, demonstrou a presença de um produto genômico do VBI apenas nas amostras de pulmão do grupo H-120, provenientes das colheitas feitas nos quatro primeiros dias pós-infecção. As demais amostras de pulmão, além de todas as amostras de traquéia de ambos os grupos experimentais, revelaram-se negativas pelo método de detecção de eletroforese em gel de agarose (dados não mostrados).

TABELA 2. Comparação entre as técnicas de isolamento viral(IV)^a, Nested-PCR (N-PCR)^b e PCR-ELISA(PCR-E)^c na detecção do VBI das amostras de pulmão e traquéia de aves experimentalmente infectadas^d.

TRAQUEIA						
Dpi	IV	A034 N-PCR	PCR-E	IV	H120 N-PCR	PCR-E
1	+	-	-	+	+	+
2	+	-	-	+	+	+
3	+	-	-	+	+	+
4	+	+	-	+	-	-
5	+	+	-	+	-	-
6	+	+	-	+	+	+
7	+	-	-	+	+	+
8	+	-	-	+	+	+
9	+	-	-	+	+	+
10	-	-	-	-	+	-
12	-	-	-	-	+	+
15	-	+	-	-	+	-
17	-	-	-	-	+	+
20	-	+	-	-	+	+

PULMÃO						
Dpi	IV	A034 N-PCR	PCR-E	IV	H120 N-PCR	PCR-E
1	+	+	-	+	+	+
2	+	+	-	+	+	+
3	+	-	-	+	+	+
4	+	+	+	+	+	+
5	+	+	-	+	+	+
6	+	+	-	+	+	+
7	-	-	-	+	+	+
8	+	-	-	+	+	+
9	+	-	-	+	+	-
10	-	-	-	-	+	-
12	-	-	-	-	+	+
15	-	+	+	-	-	-
17	-	-	-	-	+	-
20	-	-	-	-	+	+

^a Amostras foram analisadas conforme a presença (+) ou ausência (-) de lesões de nanismo, enrolamento e/ou hemorragia, nas três passagens em ovos embrionados SPF positivas.

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

^c As amostras foram positivas ou negativas conforme o valor da DO (450nm), em comparação com o ponto de corte (média mais três vezes o desvio-padrão das DO's das amostras do grupo controle - não infectado).

Tabela 3 - Frequência de detecção do VBI através dos métodos de Nested-RT-PCR (N-PCR) e PCR-ELISA (PCR-E) em amostras de traquéia e pulmão de aves infectadas experimentalmente com as estirpes H120 e A034, nos diferentes dias pós-infecção (dpi) em relação à frequência do isolamento viral (IV).

Estirpe VBI	TRAQUÉIA		
	IV	N-PCR	PCR-E
H120	9/14	12/14	10/14
A034	9/14	5/14	0/14
Estirpe VBI	PULMÃO		
	IV	N-PCR	PCR-E
H120	9/14	13/14	10/14
A034	8/14	6/14	2/14

nº amostras positivas / nº amostras testadas

A reação de Nested-PCR revelou a presença da estirpe H120 do VBI na maioria das amostras correspondentes aos diferentes dias pós-infecção testados, exceto na amostra de pulmão colhida no décimo quinto dia pós-infecção e nas amostras de traquéia do quarto e do quinto dias pós-infecção (**Figura 6a e b**). Já nas amostras do grupo A034, houve detecção do vírus no período compreendido entre o quarto e o sexto dpi, além de no décimo quinto dia dpi, tanto para as amostras de pulmão, quanto de traquéia. Não houve detecção do vírus pela técnica de Nested-PCR no terceiro dpi, no período entre o sétimo e o décimo segundo dpi, além de no décimo sétimo dia pós-infecção para ambos conjuntos de amostras teciduais. Nos demais intervalos pós-infecção, o VBI foi detectado nos primeiros dois dias pós-infecção (amostras de pulmão) e no vigésimo dpi (amostra de traquéia) (**Figura 7a e b**). Não foi demonstrada a presença do segmento gênico N do VBI, delimitado pelos primers utilizados, em nenhuma das amostras teciduais colhidas das aves do grupo controle (não infectado) (**Figura 8**).

A **Tabela 3** revela que a frequência de detecção do VBI pelo método de Nested-PCR foi maior nas amostras de pulmão do grupo H-120 (13/14) e menor nas amostras de traquéia do grupo A034 (5/14). De maneira geral, as amostras teciduais do grupo H-120 possibilitaram uma maior frequência de detecção do VBI do que aquelas amostras do grupo A034, tanto quando se considera a traquéia, como o pulmão.

A reação de PCR-ELISA foi menos sensível que o Nested-PCR, mas se mostrou mais eficiente para a detecção do VBI do que a técnica de RT-PCR.

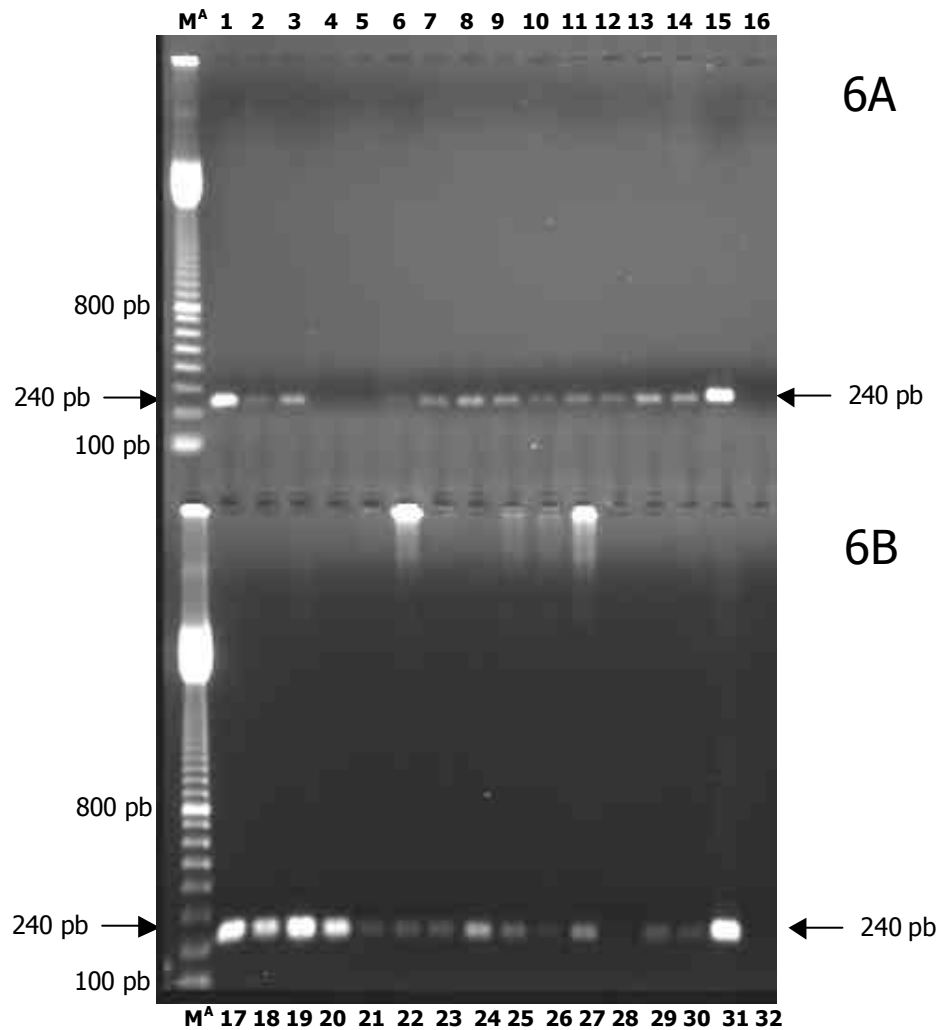


FIGURA 6. Detecção do VBI, através da reação de Nested-PCR, das amostras de traquéia (A) e pulmão (B) de aves experimentalmente infectadas com a estirpe H-120 do VBI. Legenda M^Â: Marcador de peso molecular (100 pb - Amersham Biosciences, EUA). Canaletas 1-14: amostras de pulmão coletadas, respectivamente, nos intervalos de 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,12,15,17 e 20 dias pós-infecção (dpi). Canaleta 15: controle positivo (LCA infectado com estirpe H-120). Canaleta 16: controle negativo. Canaletas 17-30: amostras de traquéia coletadas, respectivamente, nos intervalos de 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,12,15,17 e 20 dias pós-infecção (dpi). Canaleta 31: controle positivo. Canaleta 32: controle negativo. Condições da eletroforese: 20 μ l de produto de PCR, gel de agarose (1%), corado com brometo de etídeo, 100 V por 1,5 h.

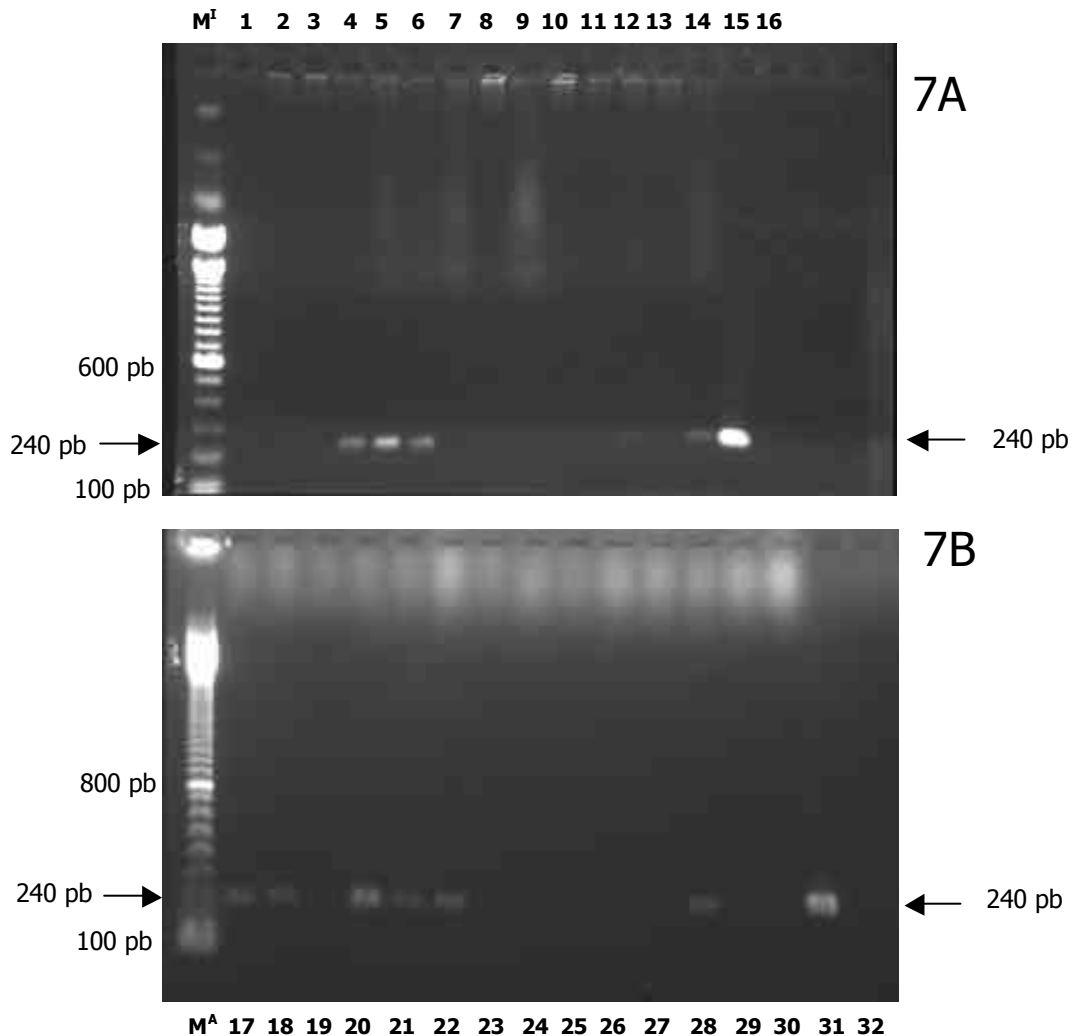


FIGURA 7. Detecção do VBI, através da reação de Nested-PCR, das amostras de traquéia (A) e pulmão (B) de aves experimentalmente infectadas com a estirpe A034 do VBI. Legenda M^A: Marcador de peso molecular (100 pb - Amersham Biosciences, EUA); M^I: Marcador de peso molecular (100 pb - Invitrogen, EUA). Canaletas 1-14: amostras de pulmão coletadas, respectivamente, nos intervalos de 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,12,15,17 e 20 dias pós-infecção (dpi). Canaleta 15: controle positivo (LCA infectado com estirpe H120). Canaleta 16: controle negativo. Canaletas 17-30: amostras de traquéia coletadas, respectivamente, nos intervalos de 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,12,15,17 e 20 dias pós-infecção (dpi). Canaleta 31: controle positivo. Canaleta 32: controle negativo. Condições da eletroforese: 20 μ l de produto de PCR, gel de agarose (1%), corado com brometo de etídeo, 100 V por 1,5 h.

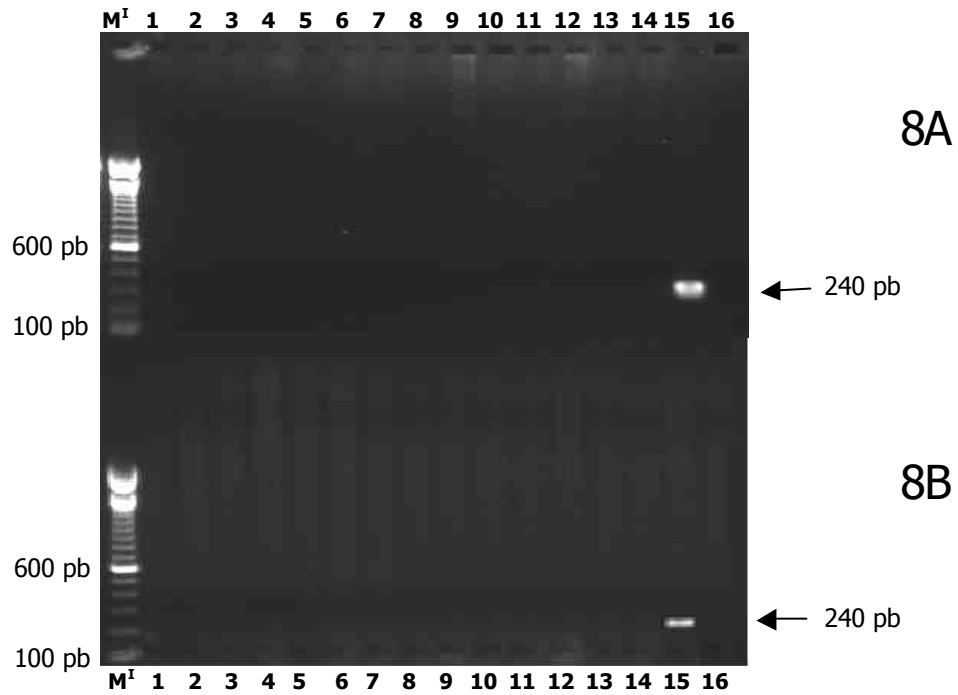


FIGURA 8 Reação de Nested-PCR, das amostras de pulmão (A) e traquéia (B) de aves do grupo controle (não infectados com o VBI) da infecção experimental. Legenda M^I: Marcador de peso molecular (100 pb - Invitrogen, EUA). Canaletas 1-14: amostras de pulmão (A) e traquéia (B) coletadas, respectivamente, nos intervalos de 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,12,15,17 e 20 dias da infecção experimental. Canaleta 15: controle positivo (LCA infectado com estirpe H-120 do VBI). Canaleta 16: controle negativo. Condições da eletroforese: 20 µl de produto de PCR, gel de agarose (1%), corado com brometo de etídeo, 100 V por 1,5 h.

6. DISCUSSÃO

Com o advento das técnicas de biologia molecular, a reação de PCR associada com a transcrição reversa (RT-PCR) tornou-se uma ferramenta amplamente empregada no diagnóstico do VBI, conferindo uma melhora significativa na sensibilidade e na especificidade dos métodos de diagnóstico desse mesmo vírus (ADZAR et al., 1996; ADZAR et al., 1997; ANDREASEN, JACKWOOD & HILT, 1991; CAVANAGH et al., 1999; FALCONE et al., 1997; JACKWOOD, KWON & HILT, 1992). No entanto, a detecção dos produtos gerados pela PCR, normalmente, é feita através da eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídio, com a visualização dos resultados feita em transiluminador UV. Ademais, por se tratar de uma prova qualitativa, a eletroforese pode fornecer resultados ambíguos, como o aparecimento de bandas fracas, ou a presença de bandas não-específicas, decorrentes de artefatos, como dímeros de primers (VESANEN et al., 1996), tendo ainda como desvantagem o risco de manipulação do brometo de etídio, um componente mutagênico, além de permitir apenas a manipulação de um número limitado de amostras a serem analisadas (VESANEN et al., 1996). Assim, a possibilidade de ser adotado um outro procedimento de biologia molecular, que prescindisse da técnica de eletroforese em gel de agarose e da coloração com brometo de etídio na detecção dos produtos gênicos amplificados, tal como ocorre com os diferentes métodos de hibridização, incluindo-se aí o PCR-ELISA, poderia trazer condições mais vantajosas ao diagnóstico virológico, inclusive na detecção do vírus da bronquite infecciosa aviária.

Ainda, com a finalidade de aumentar a sensibilidade da reação de RT-PCR, o Nested-PCR foi empregado na detecção do VBI (ADZAR et al., 1996; CAVANAGH et al., 1999; FALCONE et al., 1997). Essa última técnica revelou-se um método bastante

sensível. No entanto, várias medidas e cuidados necessitam ser adotados durante o processamento das amostras por tal metodologia, a fim de se evitar a contaminação cruzada com os fragmentos de DNA amplificados e re-amplificados e, por conseguinte, a geração de resultados falso-positivos (KHO et al., 2000).

No presente estudo, foi desenvolvido um método de diagnóstico do VBI que associa as vantagens da técnica de RT-PCR com a praticidade da detecção do produto amplificado, por meio de uma sonda empregada em uma técnica de hibridização, cuja revelação depende de um ensaio imunológico, similar ao ELISA. Esta técnica, denominada RT-PCR-ELISA, fundamenta-se na utilização de um par de primers, no qual um deles foi marcado com biotina (IBVN2), para que ocorresse a ligação do produto de DNA genômico amplificado e biotilado na superfície da cavidade da microplaca revestida com estreptavidina, já que há uma elevada afinidade entre estas duas moléculas. A seqüência genômica alvo específica foi hibridizada, em seguida, com o auxílio de uma oligo-sonda específica (primer IBV4) marcada com digoxigenina, um hapteno-alvo que permite a revelação imunoquímica dessa reação através do uso de anticorpos específicos anti-digoxigenina (VESANEN et al., 1996) marcados com a enzima peroxidase, seguido da adição da solução do substrato-cromógeno.

Pela análise das **Figuras 2 e 3**, pode-se verificar as elevadas especificidade e sensibilidade das três técnicas de biologia molecular nesse estudo empregadas para a detecção de qualquer uma das 5 estirpes do VBI testadas, o que fica ainda mais evidenciado, quando são considerados os resultados negativos observados na tentativa de detecção dos três vírus aviários heterólogos (APV, NDV e GDV). Nesse sentido, é correto supor que a seleção dos primers e da oligo-sonda aqui empregados, foi apropriada, já que tais reagentes se constituem em parâmetro de fundamental importância para conferir especificidade e sensibilidade às técnicas de RT-PCR, de Nested-RT-PCR, ou de RT-PCR-ELISA, consoante ao constatado por KHO et al. (2000), VESANEN et al. (1996) e ZWAAGSTRA, VAN DER ZEIJST & KUSTERS (1992). Ainda, o fato de tais primers/oligo-sondas terem sido desenhados para uma região altamente conservada do gene da proteína N; sendo considerados, portanto, primers “universais” para a detecção do VBI (ADZAR et al., 1996), tornou possível obter

uma boa sensibilidade dos diferentes métodos investigados, sem prejuízo, entretanto, da especificidade quando da aplicação dessas mesmas técnicas de diagnóstico do VBI, principalmente no que se refere aos patógenos virais heterólogos (APV, NDV e GDV).

Além disso, na comparação da sensibilidade da técnica de PCR-ELISA com a da RT-PCR e aquela observada no Nested-PCR (**Figura 4a e b**), ficou demonstrado que o PCR-ELISA foi 10 vezes mais sensível do que a RT-PCR, enquanto que o Nested-PCR foi 100 vezes mais sensível do que a RT-PCR e 10 vezes mais sensível que o PCR-ELISA. A maior sensibilidade do Nested-RT-PCR sobre a técnica convencional de RT-PCR já havia sido demonstrada em vários outros estudos anteriores (ADZAR et al., 1996; CAVANAGH et al., 1999; FALCONE et al., 1997; KHO et al., 2000; VESANEN et al., 1996; VILCEK et al., 1994), o mesmo ocorrendo em relação ao PCR-ELISA (KHO et al., 2000; VESANEN et al., 1996). Ademais, deve ser ressaltado que, embora a reação de Nested-PCR seja mais sensível que o PCR-ELISA, o risco inerente de contaminação torna esta técnica menos acessível (VESANEN et al., 1996). Ao contrário, a possibilidade de contaminação no PCR-ELISA é significativamente menor, o que torna esta técnica mais recomendada e segura para ser aplicada no diagnóstico de microrganismos (VESANEN et al., 1996).

A **Figura 5** mostra a cinética de detecção do VBI (DO) obtida através da aplicação da técnica de PCR-ELISA nas amostras de pulmão e traquéia provenientes das aves experimentalmente infectadas com as estirpes H-120 e A034 do VBI. Pode-se constatar que houve diferença entre os valores obtidos nas amostras de pulmão e traquéia, além de diferenças entre os grupos H-120 e A034. De modo geral, houve uma detecção mais efetiva nas amostras de pulmão do grupo de aves infectadas com a estirpe H-120, com exceção do décimo sétimo dia pós-infecção, cujo maior valor foi referente à amostra de pulmão do grupo A034. Ao se comparar os resultados da performance dos métodos de biologia molecular em relação aos tipos de tecidos, verificou-se uma melhor detecção do VBI pela técnica de PCR-ELISA nas amostras de pulmão do que na traquéia. As amostras foram consideradas negativas quando os valores de DO foram menores do que a média dos controles negativos acrescida de três vezes o desvio-padrão (BLOMQVIST et al., 1999; KHO et al., 2000).

Deve ser salientado que, tal como foi observado por KHO et al. (2000), a utilização dos valores de DO's obtidos em amostras de tecido de aves seguramente negativas de infecção pelo VBI, ao invés do branco da reação (substituição da amostra teste por água destilada), foi adotada para tornar os resultados da reação de PCR-ELISA mais fidedignos para se fazer a detecção do VBI em amostras de tecidos colhidos de aves infectadas.

Deve ficar claro também que a abordagem desse estudo priorizou a detecção do VBI, sendo que os primers e a oligo-sonda utilizados localizaram-se na região conservada do gene N. No entanto, a técnica de PCR-ELISA é, em princípio, capaz, tanto de detectar, quanto diferenciar as estirpes do VBI, desde que nela sejam empregados primers e oligo-sondas adequados, isto é, específicos para seqüências de nucleotídeos localizadas na região hipervariável do gene S. Desta forma, tal método constituir-se-ia uma alternativa viável e vantajosa para o diagnóstico do VBI e, por extensão, de outras viroses aviárias; particularmente, fazendo frente ao problema trazido ao diagnóstico correto desse vírus, pela alta taxa de variabilidade genética do VBI que é responsável pelo surgimento de estirpes variantes em plantéis comerciais (KUESTER et al., 1997).

A técnica de isolamento viral foi eficiente na detecção do VBI presente nas amostras de traquéia e pulmão infectadas, respectivamente, com as estirpe H-120 e A034 do VBI. O vírus foi recuperado entre o primeiro e o nono dia pós-infecção, com exceção da amostra de pulmão do sétimo dia pós-infecção do grupo A034. Os resultados foram compatíveis com os encontrados por OWEN et al. (1991), que detectaram a estirpe H-52 do VBI, através do isolamento viral em amostras de traquéia no terceiro, quinto, sétimo e décimo dias pós-infecção. Resultados similares também foram descritos por BRONZONI (1999), no desenvolvimento de um estudo de infecção experimental com a estirpe patogênica M-41 do VBI, no qual as aves foram infectadas aos 14 dias de idade com um título infectante de $10^{6,7}$ DIE₅₀/ml, sendo que o VBI foi isolado entre o terceiro e o décimo dias pós-infecção, em amostras de traquéia e pulmão. LUCIO & FABRICANT (1990) realizaram um estudo sobre o tropismo de três isolados cloacais do VBI em relação a amostra M-41, obtendo resultados do isolamento

viral da estirpe M-41 em amostras de traquéia e pulmão que também são coincidentes com aqueles por nós observados; isolamento viral até o nono dia pós-infecção. BHATTACHARJEE, NAYLOR & JONES (1994) utilizando o método de cultura de órgão traqueal (TOC), em diferentes concentrações de VBI inoculadas, concluíram que quanto maior a dose infectante utilizada na infecção experimental, mais precocemente o VBI pode ser detectado. Com uma dose infectante de $10^{4.5}$ foi possível detectar a cilostase nos anéis traqueais entre 6 e 24 horas pós-infecção. Este dado comprova a presença do VBI nas primeiras horas pós-infecção e está em consonância com os resultados positivos, por nós obtidos no isolamento viral do VBI durante os primeiros dias pós-infecção (primeiro e segundo dias pós-infecção) conforme mostra a **Tabela 2**.

O desenho experimental deste estudo objetivou a detecção do VBI durante a fase aguda da infecção (ou seja, nos primeiros sete dias pós infecção), estendendo-se até os vinte dias pós-infecção. Por esta razão, este trabalho deteve-se nas amostras de tecidos do trato respiratório superior (traquéia) e inferior (pulmões), por serem locais onde o VBI replica-se inicialmente, antes de disseminar-se para outros órgãos pelos quais possui tropismo. Isto já foi constatado por HOFSTAD & YODER, Jr, (1966) em um estudo no qual, após a infecção de aves com diferentes estirpes do VBI, o vírus foi isolado de amostras de traquéia e pulmões no período entre 24 horas a 8 dias pós infecção.

Os nossos resultados em relação à detecção do VBI em amostras de traquéia, através da reação de RT-PCR, foram diferentes daqueles obtidos por HANDBERG et al.(1999). Estes autores detectaram o VBI, pela reação de RT-PCR, em amostras de traquéia provenientes de aves infectadas experimentalmente com quatro estirpes diferentes desse vírus no intervalo entre o primeiro e o terceiro dias pós-infecção. Porém HANDBERG et al. (1999) utilizaram um método diferente no processamento das amostras de traquéia. A membrana mucosa de aproximadamente uma metade longitudinal das traquéias foram removidas através de um esfregaço com um bisturi. Este procedimento aumentou tanto a quantidade de material como a área da superfície traqueal analisada, bem como a extração do RNA foi realizada com kits de mini-colunas cromatográficas de centrifugação.

Contrastando com o modelo empregado por HANDBERG et al. (1999), no presente estudo foram utilizados fragmentos pequenos de três traquéias/grupo/dpi, constituindo um pool de amostras. Esta metodologia foi adotada com o objetivo de diminuir as diferenças individuais entre as aves do mesmo grupo, tornando o grupo amostral mais homogêneo. Além disto, as extrações de RNA das amostras teciduais foram efetuadas segundo as instruções do TRIZOL Reagent (GIBCO, BRL, EUA), que sugerem uma proporção ideal entre o volume do produto e o peso do fragmento do tecido. Assim, o fato de haver uma menor superfície de traquéia pode justificar uma menor eficiência nos resultados obtidos neste estudo através das técnicas moleculares, possivelmente em razão de que quanto maior a superfície empregada da mucosa traqueal, maior será a probabilidade de se obter uma carga viral mais elevada e, conseqüentemente, maior a eficiência da extração do RNA viral do material coletado. Ademais, HANDBERG et al.(1999) utilizaram aves entre 5-6 semanas de idade, para a infecção experimental, diferente de nosso estudo que utilizou aves com 14 dias de idade, sendo as dimensões das traquéias das aves dos dois experimentos diferentes entre si. Outros estudos foram realizados utilizando-se a detecção do VBI por RT-PCR, em amostras de swabs traqueais (CAPUA et al., 1999; CAVANAGH et al., 1999; JACKWOOD et al., 1997; KWON et al., 1993). A utilização de swabs traqueais permite a aplicação do RT-PCR em estudos longitudinais ou em estudos epidemiológicos a campo, sendo que presente trabalho objetivou o desenvolvimento de um método diagnóstico para a detecção do VBI diretamente em tecidos.

A reação de Nested-RT-PCR detectou a presença do VBI na maioria das amostras testadas do grupo infectado com a estirpe H120, com exceção das amostras de pulmão referentes ao décimo quinto dia pós-infecção e de traquéia provenientes do quarto e do quinto dias pós-infecção (**Figura 6**). Nas amostras teciduais de aves infectadas com a estirpe A034, houve uma detecção menos efetiva, restringindo-se ao intervalo compreendido entre o quarto e o sexto dias, além do décimo quinto dia pós-infecção em ambos tecidos (traquéia e pulmão). Houve detecção do VBI nas amostras de pulmão do grupo A034 no primeiro e segundo dias pós-infecção, bem como no vigésimo dia pós-infecção da amostra de traquéia do mesmo grupo (**Figura 7**). Deve-se

ressaltar mais uma vez que não houve detecção desse vírus nas amostras do grupo controle (não infectado), garantindo, dessa forma, que a infecção experimental foi realizada em condições adequadas (**Figura 8**).

A comparação entre os resultados das técnicas de isolamento viral (IV), Nested-PCR (N) e PCR-ELISA (PE) na detecção do VBI em amostras teciduais de aves experimentalmente infectadas, está representada nas **Tabelas 2 e 3**. Verifica-se que houve o isolamento do VBI em 64% das amostras de pulmão e traquéia de ambos os grupos experimentais, exceto nas amostras de pulmão do grupo A034, cujo valor foi 57%. Já, esse mesmo vírus foi detectado pelo Nested-PCR de maneira mais eficiente nas amostras de pulmão do grupo infectado com H-120 (93%) e em 71% das amostras de traquéia deste mesmo grupo. A frequência de detecção da técnica de Nested-PCR nas amostras do grupo infectado com A034 foi inferior tanto em pulmão (43%) quanto em traquéia (36%). A técnica de PCR-ELISA obteve uma frequência de detecção do VBI de 71% nas amostras de pulmão e traquéia do grupo H-120 e apenas 14% nas amostras de pulmão do grupo A034, sendo que não houve detecção da estirpe A034 do VBI nas amostras de traquéia por essa mesma técnica.

Em face dos dados acima referidos, pode-se afirmar que houve uma concordância no diagnóstico do VBI pelas técnicas de isolamento viral, Nested-PCR e PCR-ELISA em 57% das amostras de pulmão e em 50% das amostras de traquéia do grupo H-120 contra 43% das amostras de pulmão e 21% das amostras de traquéia do grupo A034. As amostras de pulmão propiciaram um melhor desempenho na técnica de Nested-PCR, além de terem proporcionado os maiores valores (DO's) na técnica de PCR-ELISA, revelando ser o material ideal para se fazer o diagnóstico pelos métodos de Nested-PCR e PCR-ELISA. Pode-se, nesse caso, inferir que esses resultados tenham ocorrido provavelmente em decorrência da estrutura parenquimatosa dos pulmões, o que favorece uma extração mais eficiente do RNA genômico do VBI. As amostras do grupo A034 evidenciaram uma detecção pouco efetiva em ambas as técnicas (Nested-PCR e PCR-ELISA), o que pode ser devido ao fato dessa estirpe ser nefropatogênica, tendo portanto um tropismo tecidual diferente. Deve ser salientado que

a informação sobre a nefropatogenicidade da estirpe A034 foi obtida posteriormente à realização do trabalho experimental¹.

Lesões renais foram caracterizadas e comparadas por ALBASSAM, WINTERFIELD & THACKER (1986), sendo induzidas experimentalmente em aves de 35 dias de idade, infectadas com quatro estirpes nefropatogênicas do VBI. Esses autores observaram lesões na traquéia consistentes com aquelas que são observadas no quarto dia pós-infecção por VBI. No décimo sexto dia pós-infecção, nenhuma das aves apresentou lesões significativas na traquéia, mas foi constatada a presença de lesões nos rins das aves de todos os quatro grupos experimentalmente infectados.

Além disto, ALEXANDER & GOUGH (1977), utilizando uma amostra nefropatogênica do VBI, não conseguiram fazer o isolamento viral em amostras de traquéia, após 17 dpi; contudo o vírus foi isolado de fezes ou das amostras provenientes de pool de fezes por mais de 144 dias pós-infecção. O isolamento do VBI nas fezes sugere que a replicação desse vírus ocorre no trato intestinal ou em órgãos relacionados a essa estrutura, tais como as tonsilas cecais.

Ainda, dentro desse mesmo contexto, LUCIO & FABRICANT (1990) demonstraram que estirpes cloacais do VBI possuem uma distribuição limitada nos tecidos respiratórios, sendo isoladas esporadicamente na traquéia, brônquios e pulmões. Os resultados encontrados por estes autores confirmaram que o VBI pode infectar diversos tecidos e que algumas cepas podem ser recuperadas freqüentemente nos tecidos do trato digestivo, particularmente nas tonsilas cecais. O mesmo estudo constatou que tentativas iniciais de isolamento viral do VBI no trato respiratório em aves, provenientes de plantéis avícolas com suspeita de VBI, falharam na recuperação do VBI. Estes fatos mostram que o painel de reisolamento viral de tecidos provenientes de aves infectadas difere em função das propriedades biológicas das estirpes estudadas (LUCIO & FABRICANT,1990). Isto explicaria que o desempenho pouco satisfatório das técnicas moleculares, na detecção da estirpe A034 do VBI, em ambas as amostras de tecido (pulmão e traquéia) observadas experimentalmente, ocorreu

¹ BRENTANO, L. EMBRAPA / CNPSA. Comunicação pessoal, 2002.

devido a patogenicidade desta estirpe viral e o respectivo tropismo por outros órgãos-alvo, tais como rins e tonsila cecal, e não por falhas nas técnicas de detecção em si.

LUCIO & FABRICANT (1990) sugerem também que diferenças no comportamento biológico e patogênico do VBI em relação ao isolamento viral, a partir de diferentes tecidos, poderiam ser causadas pelo baixo título viral da amostra nos diferentes tecidos, ou pela diminuição da adaptação embrionária quando re-inoculada em aves, ou ainda, por diferenças da resposta do hospedeiro à infecção. A possibilidade de que outras células, além daquelas encontradas no trato respiratório, digestivo ou renal, possam ser infectadas pelo VBI também é ressaltada como um fator importante por estes autores. Isto reforça a necessidade de incluir vários tipos de tecidos e órgãos na tentativa de se isolar ou detectar o VBI em aves infectadas a campo. Os autores concluíram que as tonsilas cecais, os rins, a traquéia, os pulmões e o esôfago devem ser incluídos na tentativa de isolamento do VBI.

Corroborando com as observações acima mencionadas, FALCONE et al. (1997) utilizaram, no desenvolvimento de RT-PCR e Nested-PCR para a detecção do VBI, amostras teciduais coletadas de aves naturalmente infectadas, sendo que cada amostra foi constituída de um pool de traquéia, pulmão, rins e tonsila cecal. Tal procedimento seria uma possível alternativa para a detecção do VBI, não apenas em relação a estirpe A034 empregada neste estudo, como também para outras estirpes do VBI (variantes de campo), cujo tropismo pelos órgãos é desconhecido.

Uma explicação plausível para o fato de algumas amostras serem negativas na técnica de isolamento viral e positivas nas reações de Nested-PCR ou PCR-ELISA seria a de que o VBI pode, depois de terem sido coletadas as amostras teciduais, sofrer redução de sua infectividade ou até mesmo uma inativação. Ainda, a possível razão para terem sido encontradas amostras que foram positivas no isolamento viral e negativas nas reações de Nested-PCR e PCR-ELISA, é a de que pode ter havido perda de RNA genômico viral, durante o processo de extração, ou ainda, que a quantidade inicial desse mesmo material presente nos tecidos coletados teria sido muito reduzida, estando provavelmente aquém do limiar de detecção desses mesmos métodos.

Ademais, deve-se levar em conta para uma melhor interpretação de tais resultados, que outros fatores relevantes, como o curso da infecção viral e o tropismo do vírus por determinados tecidos-alvo, também podem interferir de forma relevante, tal como havia sido antes observado por KHO et al. (2000) e por LUCIO & FABRICANT (1990).

Foi verificado ainda, que a eficácia do PCR-ELISA é determinada, principalmente, pelas condições da reação de PCR, destacando-se a qualidade do material genômico proveniente da extração e as condições de amplificação empregadas (LANDGRAF, RECKMANN & PINGOUD, 1991). Nesse sentido, tem sido descrito que substâncias presentes em alguns tipos de tecido (como traquéia e rins) podem conter inibidores não específicos da atividade da enzima Taq DNA polimerase (KWON et al., 1993; LIU et al., 2003). Assim, poderia ser encontrada uma explicação para a diferença entre os resultados obtidos nas amostras de traquéia e nas de pulmão, nos diversos métodos de biologia molecular aqui testados, bem como a discordância de resultados negativos revelados nessas técnicas em comparação com os resultados positivos obtidos no isolamento viral.

7. CONCLUSÕES

Em face dos resultados por nós encontrados e por todo o exposto no tópico Discussão pode-se concluir que:

7.1 A técnica de RT-PCR-ELISA, desenvolvida nesse estudo, foi capaz de detectar o VBI em amostras de tecidos (traquéia e pulmão), e em fluidos biológicos (LCA) de aves experimentalmente infectadas;

7.2 A técnica de RT-PCR-ELISA apresentou sensibilidade e especificidade analíticas elevadas, sendo 10 vezes mais sensível que a técnica de RT-PCR e 10 vezes menos sensível que o método de Nested-PCR. Além disso, este método foi bastante específico no diagnóstico do VBI, não tendo havido a detecção dos vírus aviários heterólogos testados (APV, NDV e GDV);

7.3 Deve-se empregar, na técnica de RT-PCR-ELISA, "pools" de vários órgãos pelos quais o vírus apresenta tropismo potencial, como traquéia, pulmão, rins, tonsila cecal, ovidutos a fim de aumentar a sensibilidade de detecção do VBI, ao invés de apenas um tipo de tecido ou órgão isoladamente.

7.4 A reação de PCR-ELISA, utilizada pela primeira vez para o diagnóstico direto do VBI, demonstrou ser um método acessível e rápido na detecção deste vírus, além de permitir a análise de um grande número de amostras simultaneamente, tendo o potencial de ser aplicada na rotina do diagnóstico laboratorial da bronquite infecciosa aviária;

7.5 O método de RT-PCR-ELISA revelou-se tão específico quanto as técnicas de isolamento viral e Nested-PCR, porém foi menos sensível do que esses mesmos métodos na detecção do VBI, especialmente para estirpes com tropismos teciduais diferentes daquele direcionado ao trato respiratório.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADZAR, A. et al. Molecular analysis of the 793/B serotype of infectious bronchitis virus in Great Britain. **Avian Pathol.**, v. 26, p. 625-640, 1997.

ADZAR, A. et al. Universal oligonucleotides for the detection of infectious bronchitis virus by the polymerase chain reaction. **Avian Pathol.**, v. 25, p. 817-836, 1996.

ALBASSAM, M.A.; WINTERFIELD, R.W. & THACKER, H.L. Comparison of the nephropathogenicity of four strains of infectious bronchitis virus. **Avian Dis.**, v. 30, p. 468-476, 1986.

ALEXANDER, D.J. & GOUGH, R.E. Isolation of avian infectious bronchitis virus from experimentally infected chickens. **Res. Vet. Sci.**, v. 23, p. 344-347, 1977.

ALEXANDERSEN, S. et al. Development of reverse transcription-PCR (oligonucleotide probing) enzyme-linked immunosorbent assays for diagnosis and preliminary typing of Foot-and-Mouth disease: a new system using simple and aqueous-phase hybridization. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, p. 4604-4613, 2000.

AMBALI, A.G. & JONES, R.C. Early pathogenesis in chicks of infection with an enterotropic strain of infectious bronchitis virus. **Avian Dis.**, v. 34, p. 809-817, 1990.

ANDREASEN, Jr, J.R.; JACKWOOD, M.W. & HILT, D.A. Polymerase chain reaction amplification of the genome infectious bronchitis virus. **Avian Dis.**, v. 35, p. 216-220, 1991.

ARRUDA, E. et al. Frequency and natural history of rhinovirus infectious in adults during autumn. **J. Clin. Microbiol.**, v. 35, p. 2864-2868, 1997.

ARVIDSON, Y. A model for determining immunogenic relationships between avian infectious bronchitis viruses. **Arch. Virology**, v. 111, p. 227-238, 1990.

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

BLOMQUIST, S. et al. Rapid detection of human rhinoviruses in nasopharyngeal aspirates by a microwell reverse transcription-PCR-hybridization assay. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, p. 2813-2816, 1999.

BOURSNELL, M.E.G.; BINNS M.M. & BROWN, T.D.K. Sequencing of coronavirus IBV genomic RNA: three open reading frames in the 5' 'unique' region of mRNA D. **J. Gen. Virol.**, v. 66, p. 2253-2258, 1985.

BOURSNELL, M.E.G et al. Sequences of the nucleocapsid genes from two strains of avian infectious bronchitis virus. **J. Gen. Virol.**, v. 66, p. 573-580, 1985.

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

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

BROWN, A.J. & BRACEWELL, C.D. Application of the haemagglutination inhibition test to typing of infectious bronchitis virus. **Vet. Rec.**, v. 116, p. 47-48, 1985.

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

CAPUA, I. et al. Co-circulation of four types of infectious bronchitis virus (793/B, 624/I, B1648 and Massachusetts). **Avian Pathol.**, v. 28, p. 587-592, 1999.

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

CAVANAGH, D. Coronavirus IBV: further evidence that the surface projections are associated with two glycopolypeptides. **J. Gen. Virol.**, v. 64, p. 1787-1791, 1993.

CAVANAGH, D. The coronavirus surface glycoprotein. In: SIDDELL, S.G. **The Coronaviridae**. New York: Plenum Press, 1995. p. 73-114.

CAVANAGH, D. Nidovirales: a new order comprising Coronaviridae and Arteriviridae. **Arch. Virol.**, v. 142, p. 629-633, 1997.

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

CAVANAGH, D.; DAVIS, P.J. & COOK, J.K.A. Infectious bronchitis virus: evidence for recombination within the Massachusetts serotype. **Avian Pathol.**, v. 21, p. 401-408, 1992.

CAVANAGH, D. et al. Coronavirus IBV: virus retaining spike glycopolypeptide S2 but not S1 is unable to induce virus-neutralizing or haemagglutination-inhibiting antibody, or induce chicken tracheal protection. **J. Gen. Virol.**, v. 67, p. 1435-1442, 1986.

CAVANAGH, D.; DAVIS, P.J. & MOCKETT, A.P.A. Amino acids within hypervariable region 1 of avian coronavirus IBV (Massachusetts serotype) spike glycoprotein are associated with neutralization epitopes. **Virus Res.**, v. 11, p. 141-150, 1988.

CAVANAGH, D.; ELLIS, M.M. & COOK, J.K.A. Relationship between sequence variation in the S1spike protein of infectious bronchitis virus and the extent of cross protection in vivo. **Avian Pathol.**, v. 26, p. 63-74, 1997.

CAVANAGH, D. et al. Longitudinal field studies of infectious bronchitis virus and avian pneumovirus in broilers using type-specific polymerase chain reactions. **Avian Pathol.**, v. 28, p. 593-605, 1999.

CAVANAGH, D. & NAQI A. Infectious Bronchitis. In: CALNEK, B.W. et al. **Diseases of Poultry**, 10th ed. Ames: Iowa State University Press, 1997. p. 511-526.

CHEN, B.Y. et al. Histopathology and immunohistochemistry of renal lesions due to infectious bronchitis virus in chicks. **Avian Pathol.**, v. 25, n. 2, p. 269-283, 1996.

CHUBB, R.C. The detection of antibody to avian infectious bronchitis virus by the use of immunofluorescence with tissue sections of nephritic kidneys. **Aust. Vet. J.**, v. 63, p. 131-132, 1986.

CHUBB, R.C. & CUMMING, R.B. The use of the gel diffusion precipitin technique with avian infectious bronchitis nephritis virus. **Aust. Vet. J.**, v. 47, p. 496-499, 1971.

CLARKE, J.K.; McFERRAN, J.B. & GAY, F.W. Use of allantoic cells for the detection of avian infectious bronchitis virus. **Arch. Gesamte Virusforsch.**, v. 36, p. 62-70, 1972.

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

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

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

COOK, J.K.A.; SMITH, H.W. & HUGGINS, M.B. Infectious bronchitis immunity: its study in chickens experimentally infected with mixtures of infectious bronchitis virus and *Escherichia coli*. **J. Gen. Virol.**, v. 67, p. 1427-1434, 1986.

COWEN, B.S. & HITCHNER, S.B. Serotyping of avian infectious bronchitis viruses by the virus-neutralization test. **Avian Dis.**, v. 19, p. 583-595, 1975.

CUNNINGHAM, C.H. Avian infectious bronchitis. **Adv. Vet. Sci. Comp. Med.**, v. 14, p. 105-148, 1970.

DARBYSHIRE, J.H. Organ culture in avian virology: a review. **Avian Pathol.**, v. 7, p. 321-335, 1978.

DARBYSHIRE, J.H et al. Taxonomic studies on strains of avian infectious bronchitis virus using neutralization tests in tracheal organ cultures. **Arch. Virol.**, v. 61, p. 227-238, 1979.

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

DAWSON, P.S. & GOUGH, R.E. Antigenic variation in strains of avian infectious bronchitis virus. **Arch. Gesamte Virusforsch.**, v. 34, p. 32-39, 1971.

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

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

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

DI FÁBIO, J. et al. Characterization of infectious bronchitis viruses isolated from outbreaks of diseases in commercial flocks in Brazil. **Avian Dis.**, v.44, p.582-589, 2000.

DOI, M. et al. Serotypes of avian infectious bronchitis virus isolates from field cases in Japan. **Avian Dis.**, v. 26, p. 946-956, 1982.

EL-HOUADFI, M.D et al. The isolation and characterization of six avian infectious bronchitis viruses isolated in Morocco. **Avian Pathol.**, v. 15, p. 93-105, 1986.

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

GALLAGHER, T.M.; PARKER, S.E. & BUCHMEIER, M.J. Neutralization-resistant variants of a neurotrophic coronavirus are generated by deletions within the amino-terminal half of the spike glycoprotein. **J. Virol.**, v. 64, p. 731-741, 1990.

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

GELB, Jr, J.; WOLFF, J.B. & MORAN, C.A. Variant serotypes of infectious bronchitis virus isolated from commercial layer and broiler chickens. **Avian Dis.**, v. 35, p. 82-87, 1991.

HANDBERG, K.J. et al. Detection and strain differentiation of infectious bronchitis virus in tracheal tissues from experimentally infected chickens by reverse transcription-polymerase chain reaction. Comparison with an immunohistochemical technique. **Avian Pathol.**, v. 28, p. 327-35, 1999.

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

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

HITCHNER, S.B. A virus neutralization screening test: its limitations in classifying field isolates of infectious bronchitis virus. **Avian Pathol.**, v. 2, p. 103-109, 1973.

HOFSTAD, M.S. Antigenic differences among isolates of avian infectious bronchitis virus. **Am. J. Vet. Res.**, v. 19, p. 740-743, 1958.

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

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

HOPKINS, S.R. & YODER, Jr, H.W. Reversion to virulence of chicken passaged infectious bronchitis vaccine virus. **Avian Dis.**, v. 30, p. 221-223, 1986.

HOY, M.A. **Insect molecular genetics: an introduction to principles and applications.** San Diego: Academic Press, 1994. p. 203-245.

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

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

INNIS, M.A. & GELFAND, D.H. Optimization of PCRs. In: INNIS, M.A. et al. **PCR Protocols : a guide to methods and applications.** San Diego: Academic Press, 1990. p. 3-12.

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

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

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

JORGE, M.A.; RESENDE, J.S. & OLIVEIRA, R.L. Levantamento sorológico em frangos em Minas Gerais: doença de Gumboro, bronquite infecciosa e doença de Newcastle. **Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.**, v. 44, n. 6, p. 545-47, 1992.

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

KATZ, J.B. et al. Colorimetric diagnosis of prolonged bluetongue viremia in sheep, using an enzyme-linked oligonucleotide sorbent assay of amplified viral nucleic acids. **Am. J. Vet. Res.**, v. 54, p. 2021-2026, 1993.

KEELER, C.L. et al. Serotype identification of avian infectious bronchitis virus by RT-PCR of the peplomer (S-1) gene. **Avian Dis.**, v. 42, p. 275-284, 1998.

KHO, C.L. et al. Performance of an RT-nested PCR ELISA for detection of Newcastle disease virus. **J. Virol. Methods**, v. 86, p.71-83, 2000.

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

KING, D.J & HOPKINS S.R. Rapid serotyping of infectious bronchitis virus isolates with the haemagglutination inhibition test. **Avian Dis.**, v. 28, p. 727-733, 1984.

KOCH, G. et al. Antigenic domains of the peplomer protein of avian infectious bronchitis virus: correlation with biological functions. **J. Gen. Virol.**, v. 71, p. 1929-1835, 1990.

KOTTIER, S.A.; CAVANAGH, D. & BRITTON, P. Experimental evidence of recombination in coronavirus infectious bronchitis virus. **Virology**, v. 213, p. 569-580, 1995.

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

KUSTERS, J.G. et al. Molecular epidemiology of infectious bronchitis virus in the Netherlands. **J. Gen Virol.**, v. 68, p. 343-352, 1987.

KUSTERS, J.G. et al. Phylogeny of antigenic variants of avian coronavirus IBV. **Virology**, v. 169, p. 217-221, 1989.

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

KWON, H.M. et al. Polymerase chain reaction and a biotin-labeled DNA probe for detection of infectious bronchitis virus in chickens. **Avian Dis.**, v. 37, p. 149-156, 1993.

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

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

LAI, M.M.C. et al. Coronavirus: how a large RNA viral genome is replicated and transcribed. **Infect. Agents Dis.**, v. 3, p. 98-105, 1994.

LANDGRAF, A.; RECKMANN, B. & PINGOUD, A. Direct analysis of polymerase chain reaction products using enzyme-linked immunosorbent assay techniques. **Anal. Biochem.**, v. 198, p. 86-91, 1991.

LAUDE, H. & MASTERS P.S. In: SIDDELL, S.G. **The Coronaviridae**. New York: Plenum Press, 1995. p. 141-163.

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

LEIBOWITZ, J.L.; WILHELMSSEN, K.C & BOND, C.W. The virus-specific intracellular RNA species of two murine coronaviruses: MHV-A59 and MHV-JHM. **Virology**, v. 114, p. 39-51, 1981.

LIN, Z. et al. A new typing method for the avian infectious bronchitis virus using polymerase chain reaction and restriction enzyme fragment length polymorphism. **Arch. Virol.**, v. 116, p. 19-31, 1991.

LIU, H.J. et al. Detection of infectious bronchitis virus by multiplex polymerase chain reaction and sequence analysis. **J. Virol. Methods**, v. 109, p. 31-37, 2003.

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

LUCIO, B. & HITCHNER, S.B. Differentiation and detection of infectious bronchitis virus subtypes by immunofluorescence. **Avian Dis.**, v. 14, p. 9-24, 1970.

LOHR, J.E. Serologic differences between strains of infectious bronchitis virus from New Zealand, Australia and the United States. **Avian Dis.**, v. 20, p. 478-482, 1975.

MOCKETT, A.; CAVANAGH D. & BROWN T. Monoclonal antibodies to the S1 spike and membrane proteins of avian infectious bronchitis coronavirus strain Massachusetts M41. **J. Gen. Virol.**, v. 65, p. 2281-2286, 1984.

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

MULLIS, K. et al. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. **Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.**, v. 51, p. 263-273, 1986.

NAKAMURA, K. et al. Comparative study of respiratory lesions in two chickens lines of different susceptibility infected with infectious bronchitis virus: histology, ultrastructure and immunohistochemistry. **Avian Pathol.**, v. 20, p. 241-257, 1991.

NIESTERS, H. et al. Epitopes on the peplomer protein of infectious bronchitis virus strain M41 as defined by monoclonal antibodies. **Virology**, v. 161, p. 511-519, 1989.

OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES (OIE). Avian infectious bronchitis. In: **Manual of standarts for diagnostic tests and vaccines**. 2000. Disponível em: <http://www.oie.int/eng/normes/MANUAL/A_0091.htm>. Acesso em: 19 fev. 2001.

OSTE, C. Polymerase chain reaction. **Bio-Tech.**, v. 6, p. 162-167, 1988.

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

PARR, R.L. & COLLISSON, E.W. Epitopes on the spike protein of a nephropathogenic strain of infectious bronchitis virus. **Arch. Virol.**, v. 133, p. 369-383, 1993.

PENZES, Z. et al. Characterization of a replicating and packaged defective RNA of avian coronavirus infectious bronchitis virus. **Virology**, v. 203, p. 286-293, 1994.

REED, L.J. & MUENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent end points. **Am. J. Hyg.**, v. 27, p. 493-497, 1938.

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

SAIKI, R.K. et al. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, v. 230, p. 1350-1354, 1985.

SAPATS, S.I. et al. Novel variation in the N protein of avian infectious bronchitis virus. **Virology**, v. 226, p. 412-417, 1996.

SCHALK, A.F. & HAWN, M.C. An apparently new respiratory disease of baby chicks. **Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 78, p. 413-22, 1931.

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

SIDDEL S.; WEGE H. & TER MEULEN, V. The biology of coronaviruses. . **J. Gen. Virol.**, v. 64, p. 761-776, 1983.

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

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

STERN, D.F. & KENNEDY, S.I.T. Coronavirus multiplication strategy. II. Mapping the avian infectious bronchitis virus intracellular RNA species to the genome. **J. Virol.**, v. 36, p. 440-449, 1980b.

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

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

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

SUTOU, S. et al. Cloning and sequencing of genes encoding structural proteins of avian infectious bronchitis virus. **Virology**, v. 165, p. 589-595, 1988.

VESANEN, M. et al. Detection of herpes simplex virus DNA in cerebrospinal fluid samples using the polymerase chain reaction and microplate hybridization. **J. Virol. Methods**, v. 59, p.1-11, 1996.

VILCEK, S. et al. Development of nested PCR assays for detection of bovine respiratory syncytial virus in clinical specimens. **J. Clin. Microbiol.**, v. 32, p. 2225-2231, 1994.

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

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

YAGYU, K. & OHTA, S. Detection of infectious bronchitis virus antigen from experimentally infected chickens by indirect immunofluorescent assay with monoclonal antibody. **Avian Dis.**, v. 37, p. 157-169, 1990.

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