

T686-089 69

A162i

2000

JOSIANE TAVARES DE ABREU

**IDENTIFICAÇÃO DE ISOLADOS BRASILEIROS DO VÍRUS DA
BRONquite infecciosa das galinhas com RT-PCR UNIVERSAL E
ANÁLISES POR RFLP DE PARTE DO GENE N**

Dissertação apresentada à Escola de Veterinária da
Universidade Federal de Minas Gerais, como
requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em
Medicina Veterinária.

Área: Medicina Veterinária Preventiva.

Orientador: Prof. Dr. Nelson Rodrigo da Silva Martins.

Belo Horizonte
UFMG - Escola de Veterinária
2000

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA

15/09/00

853900-06

0295-10160

A 162 i Abreu, Josiane Tavares de, 1974 -

2000

Identificação de isolados brasileiros do vírus da bronquite infecciosa das galinhas com RT-PCR universal e análise por RFLP de parte do gene N/ Josiane Tavares de Abreu. - Belo Horizonte: Escola de Veterinária, 2000.

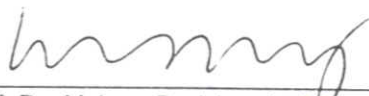
51 p. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária.

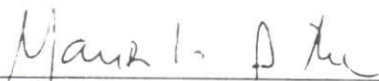
1. Aves domésticas - Doenças - Teses. 2. Bronquite infecciosa das galinhas - Diagnóstico - Teses. I. Título.

CDD - 636.508 969 62

Dissertação defendida e aprovada em 10 de abril de 2000, pela Comissão examinadora constituída por:



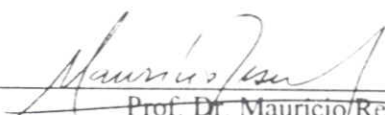
Prof. Dr. Nelson Rodrigo da Silva Martins
Orientador



Prof. Dr. Maurilio Andrade Rocha



Profa. Dra. Ana Paula Salles Moura Fernandes



Prof. Dr. Mauricio Resende

À Deus pelas oportunidades e força. Aos meus pais, José e Sônia, pelo carinho, apoio e compreensão. Ao meu amor Leonardo pelo companheirismo e presença constante. Aos meus irmãos, Viviane e Marcos, pela paciência e ajudas prestadas. Ao meu grande amigo e orientador de tese Prof. José Sérgio de Resende pelos ensinamentos e amizade.

Dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me dado: dificuldades para me fortalecer ao invés de força, problemas para resolver ao invés de sabedoria, cérebro e músculos para trabalhar ao invés de prosperidade, perigos para superar ao invés de coragem, pessoas com problemas para ajudar ao invés de amor, persistência para prosseguir ao invés de desistir frente ao primeiro obstáculo e no lugar de favores oportunidades. Eu não recebi nada do que pedi ... Mas recebi tudo de que precisava.

Agradeço especialmente ao grande homem, profissional, professor e amigo, Prof. José Sérgio de Resende, pela primorosa orientação da tese e ensinamentos prestados.

Ao meu orientador do curso de mestrado Prof. Nelson Rodrigo Martins pelas inúmeras ajudas prestadas, apoio e confiança.

Ao Prof. Maurício Resende pelos incontáveis auxílios e sugestões dadas nos diversos momentos de desespero durante o curso de mestrado.

Aos membros da banca examinadora, Prof. Nelson Rodrigo da Silva Martins, Prof. Maurício Resende, Prof. Maurílio Andrade Rocha, Prof. Nelson Carneiro Baião e Prof. Ana Paula Salles Moura Fernandes, pelas contribuições dadas a este trabalho e que foram muito úteis para o engrandecimento deste.

Aos meus colegas de trabalho Sallate, Cleiton e Fernanda, pela amizade, apoio e prazeroso trabalho realizado em equipe. Aos meus queridos colegas de mestrado, obrigada pela companhia.

Ao pesquisador Max Augusto Jorge pelas sugestões e companhia.

Aos funcionários Cláudio e Ismael, pelas ajudas e pelo ótimo convívio durante todo o tempo de mestrado e iniciação científica. À nossa "anjo - da - guarda" Nádia pela paciência, inesgotável bom humor e por ter evitado que este trabalho desaparecesse do computador por diversas vezes.

À equipe do Laboratório de Virologia Comparada do ICB, especialmente a Betânia, Tânia e Betinha, pela paciência e prestatividade em diversas etapas da tese.

Aos meus amigos Pena Branca e Frei, pela força e conselhos jamais esquecidos.

Aos meus pais, irmã e irmão, avó, tios, tias, primos e primas, obrigado por existirem e por fazerem parte da minha vida. Ao Leonardo, meu grande amor, por ter aquecido todos esses dias que estamos juntos e pelo exemplo de determinação dado a cada dia.

À minha irmã emprestada Francilane, obrigada pela amizade e contínua presença.

Ao meu eterno amigo Lioukin (*in memoriam*) pelo seu amor incondicional e puro. Ainda sinto saudades!

*" Posso dizer: Estou pronto
para me dar ao que vier.
Posso errar, mas não por medo
de me ser no que fizer.
... não tenho caminho novo.
O que tenho de novo
é o jeito de caminhar. "*

SUMÁRIO

	RESUMO.....	9
	ABSTRACT.....	9
1	INTRODUÇÃO.....	11
2	OBJETIVOS.....	12
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	12
3.1	HISTÓRICO.....	12
3.2	A DOENÇA.....	13
3.3	ETIOLOGIA E BIOLOGIA MOLECULAR DO VBIG.....	14
3.4	NOVAS VARIANTES.....	18
3.5	DIAGNÓSTICO.....	18
3.6	CONTROLE.....	21
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
4.1	AMOSTRAS DE VÍRUS.....	22
4.2	REPLICAÇÃO E CONCENTRAÇÃO VIRAL.....	24
4.3	EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL (INCLUINDO O VIRAL).....	25
4.4	OLIGONUCLEOTÍDEOS (OLIGOS).....	26
4.5	SÍNTESE DE cDNA (DNA COMPLEMENTAR) - TRANSCRIÇÃO REVERSA (RT).....	29
4.6	REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR).....	30
4.7	ANÁLISE DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS.....	30
4.8	ANÁLISE DO POLIMORFISMO NOS FRAGMENTOS OBTIDOS COM O USO DE ENZIMAS DE RESTRIÇÃO (RFLP).....	31
4.9	ANÁLISE DOS PRODUTOS DE DIGESTÃO ENZIMÁTICA.....	31
4.10	BIOSSEGURANÇA LABORATORIAL.....	31
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
5.1	REPLICAÇÃO E CONCENTRAÇÃO VIRAL.....	32
5.2	EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL (INCLUINDO O VIRAL).....	33
5.3	SÍNTESE DE cDNA (DNA COMPLEMENTAR).....	33
5.4	AMPLIFICAÇÃO DO cDNA (PCR).....	33
5.5	ANÁLISE POR RFLP.....	37
6	CONCLUSÕES.....	40
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Amostras de referência de VBIG usadas como controles positivos.....	23
Tabela 2	Amostras de VBIG isoladas de surtos clínicos da BIG na avicultura industrial no Estado de Minas Gerais entre 1972 e 1989.....	24
Tabela 3	Oligonucleotídeos, seqüências de bases e localização no gene que codifica a proteína N do VBIG.....	26
Tabela 4	Concentrações inicial e final dos reagentes utilizados na PCR após otimização.....	30

Tabela 5	Concentrações inicial e final dos reagentes utilizados na reação de digestão pela enzima <i>AvaII</i>	31
Tabela 6	Agrupamento das amostras de VBIG [referência (GenBank + Estudo) e brasileiras] com base na análise por restrição enzimática da parte estudada do gene N.....	38

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Morfologia esquemática do coronavírus.....	15
Figura 2	Genoma do VBIG e representação do esquema de replicação viral.....	15
Figura 3	Seqüência do fragmento da amostra M41 obtida no GenBank e regiões reconhecidas pelos oligos BIGN1 e BIGN2 (negrito).....	26
Figura 4	Análise do gel de agarose 2% corado com brometo de etídio contendo os produtos da PCR realizada durante o processo de otimização da reação.....	34
Figura 5	Análise do gel de agarose 1% corado com brometo de etídio contendo os produtos da PCR realizada durante o processo de otimização da reação.....	35
Figura 6	Análise do gel de agarose 2% corado com brometo de etídio contendo os produtos da PCR obtidos das amostras de VBIG (referência e brasileiras) testadas. Reação otimizada.....	36
Figura 7	Análise por RFLP em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio dos produtos amplificados (parte do gene N das amostras de VBIG- referência e brasileiras) por RT-PCR digeridos com <i>AvaII</i>	37

RESUMO

A transcrição reversa seguida da reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR), empregando os oligonucleotídeos BIGN1 e BIGN2, foi utilizada com sucesso para a amplificação e detecção de parte do gene do nucleocapsídeo (N) de amostras do vírus da bronquite infecciosa das galinhas (VBIG). Nove amostras de referência e 15 isoladas de casos clínicos da doença no Estado de Minas Gerais entre 1972 e 1989, apresentaram a banda específica de 438 pb. de parte do gene N responsável pela codificação da região amino terminal da nucleoproteína. O produto principal de amplificação foi confirmado pela análise do polimorfismo nos comprimentos dos fragmentos obtidos com o uso de enzimas de restrição (RFLP). Os tamanhos dos fragmentos obtidos pela digestão desta região genômica viral pela enzima *AvaII* das amostras M41 e Ark-99, segundo dados do GenBank e WebGene, eram de 234, 138 e 66 pb. No presente estudo, a *AvaII* gerou fragmentos visíveis após eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio em torno de 240 pb., 140 pb. e 60 pb. nas mesmas amostras de referência citadas anteriormente, M41 e Ark-99, como também nas seguintes amostras de referência, A5968, SE-17, UK 6/82, Iowa 609 e Iowa 97, e em mais nove amostras brasileiras. As amostras de referência JMK e H-52 apresentaram bandas em torno de 400 pb. e 40 pb., também encontradas em três amostras brasileiras e coincidindo com o mapa de restrição apresentado pela amostra Q3/88 no GenBank. As amostras brasileiras 297, 283 e 290 não concordaram com nenhuma amostra de referência e nem com as outras brasileiras, sugerindo que estas apresentam alguma recombinação ou mutação nesta região do gene N. Sendo assim, a RT-PCR estudada pode ser utilizada na triagem do VBIG em amostras isoladas no Brasil, devido ao alto grau de conservação desta região genômica viral entre diferentes amostras. O uso de RFLP com a enzima de restrição *AvaII* permitiu diferenciar amostras pertencentes ao mesmo sorotipo, como também possibilitou o estudo de similaridade de amostras pertencentes a sorotipos distintos agrupando-as em grandes grupos.

Palavras - chave: RT-PCR/ RFLP; bronquite infecciosa das galinhas; nucleocapsídeo; diagnóstico; doenças das aves; galinha.

ABSTRACT

The reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) employing oligonucleotides BIGN1 and BIGN2, specific to a conserved segment of the nucleoprotein gene (N-gene) of infectious bronchitis virus (IBV) followed by restriction fragment length polymorphism (RFLP) of the RT-PCR products, were used to, respectively, detecting and analyzing IBV isolates of Minas Gerais, Brazil. The N-genes amino-terminal 438 bp segments of nine reference strains (M41, A5968, SE-17, Ark-99, Iowa 609, Iowa 97, JMK, H-52 and UK 6/82) and fifteen Brazilian isolates (208-10, TII, G, 29/78, 200, 283, 290, 297, 327, 351, PM1, PM2, PM3, PM4, 319) of fields outbreaks of infectious bronchitis in broilers, except for 208-10, in layers, were successfully amplified. The RFLP analysis of N-gene RT-PCR products using *AvaII* generated 240 bp, 140 bp and 60 bp fragments of strains M41, A5968, SE-17, UK 6/82, Iowa 609 and Iowa 97 and nine of the Brazilian isolates. Bands of approximately 400 bp and 40bp were observed for strains JMK and H-52 and for three of the Brazilian isolates, comparable to those described in the GenBank for Q3/88 strain. Considering that the Brazilian isolates 283/83, 290/83 and 297/83 did not show a similar profile to any of the reference strains employed, these may consist of N-gene mutant isolates. The RT-PCR may be applied to diagnosis of IBV isolates due to the high conservation of the N gene region among all IBV strains, as described in the literature. The use of RFLP employing *AvaII* has enabled the differentiation of isolates within a serotype as well as the study of similarities among isolates of distinct serotypes, allowing grouping into large clusters.

Keywords: RT-PCR/ RFLP; infectious bronchitis virus; nucleocapsid gene; diagnosis; avian diseases; chicken.

1. INTRODUÇÃO

A bronquite infecciosa das galinhas (BIG) é uma doença viral altamente contagiosa, encontrando-se, atualmente, disseminada por todo o mundo, sendo a principal causa de doença respiratória em frangos de corte e responsável por enormes perdas econômicas, devidas ao aumento na taxa de mortalidade, desuniformidade do lote, redução do consumo de alimentos e do ganho de peso, aumento de condenação de carcaças em abatedouros e queda na produção e na qualidade interna e externa dos ovos (Cavanagh & Naqi, 1997).

O controle da doença é difícil devido à diversidade de sorotipos e variantes do vírus presentes e já isolados em diversas partes do mundo, inclusive no Brasil (Gelb, 1988; Gelb et al., 1991; Karaca et al., 1990; Martins et al., 1996; Cavanagh & Naqi, 1997; Epiphanyo, 1998; Souza, 1999), onde somente o sorotipo Massachusetts, amostra Holland, está liberado para a produção de vacinas vivas comerciais. Aparentemente, mas ainda dependendo de estudo mais amplo de isolados, este sorotipo já não é suficiente para evitar o surgimento de surtos de doença em diversas partes do país (Wentz, 1988; Di Fábio; 1993; Lunge et al., 1998; Ikuta, 1999).

Outro problema relacionado com a BIG reside nos atuais métodos de diagnóstico utilizados, sendo estes soroneutralização (SN) em ovos embrionados de galinhas (OEG) isentos de patógenos específicos (SPF - *Specific Pathogen Free*) (Karaca et al., 1990), em cultivos de anéis de traquéia (CAT) (Darbyshire et al., 1979) ou em cultivo celular (Cowen & Hitchner., 1975), inibição da hemaglutinação (IH) (Alexander et al., 1976; Paniago, 1994), diversos métodos de ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) (Ndifuna et al., 1998), como, também, o isolamento do vírus por passagens seriadas em OEG/SPF ou por inoculação intra-traqueal em pintos SPF (Cavanagh & Naqi, 1997). Além de laboriosos e demorados, esses testes apresentam resultados inconclusivos devidos às reações cruzadas e omissão de novas amostras (Villegas, 1997; Wit et al., 1997), dificultando a realização de estudos epidemiológicos sobre a doença, como também e, principalmente, o seu controle.

Por outro lado, o diagnóstico têm sido realizado com sucesso pelo método da transcrição reversa seguida da reação em cadeia pela polimerase ("*Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction*" - RT-PCR) para várias regiões genômicas do vírus com diversos graus de variação entre amostras do VBIG (Koch et al., 1990; Lin et al., 1991; Kwon et al., 1993 a, b; Wang & Tsai, 1996). Visando evitar resultados falsos negativos e com o objetivo de aplicar como método de diagnóstico primário, Zwaagstra et al. (1992) utilizaram oligonucleotídeos que reconheceram uma região altamente conservada do gene N. O teste reduziria o número de procedimentos e de etapas realizadas, a quantidade de material a ser utilizado e, conseqüentemente, o custo do diagnóstico, pois somente as amostras positivas seriam posteriormente tipificadas.

Apesar destes oligonucleotídeos terem sido avaliados com amostras isoladas em outros países com ótimos resultados (Adzhar et al., 1996; Wang & Tsai., 1996), os mesmos não foram estudados com amostras brasileiras. Sendo assim, este estudo visou avaliar os oligos idealizados por Zwaagstra et al. (1992) para a porção mais conservada do gene N em amostras sabidamente positivas para BIG (de referência e brasileiras isoladas de casos clínicos da doença em lotes de frangos de corte e poedeiras não vacinados), procurando confirmar a sua universalidade para a detecção do VBIG.

Por outro lado, foi demonstrado por seqüenciamento (Williams et al., 1992; Zwaagstra et al., 1992) que este fragmento do gene N, apesar de altamente conservado, apresentava pequenas diferenças entre amostras sorologicamente indistinguíveis de VBIG, o que poderia servir como um instrumento valioso para estudos epidemiológicos e de filogenia do vírus. Mas nenhum estudo de RFLP ("*Restriction Fragments Length Polymorphism*" - polimorfismo nos comprimentos dos fragmentos obtidos com o uso de enzimas de restrição) foi conduzido para o gene do nucleocapsídeo, o qual é um teste mais facilmente utilizado em laboratórios de rotina comparado ao de seqüenciamento. O teste de RFLP têm sido basicamente voltado para o gene que codifica a proteína S1, a qual apresenta determinantes antigênicos indutores de anticorpos neutralizantes e do sorotipo e o

maior grau de variação entre as amostras de VBIG se comparada às outras proteínas estruturais (Kursters et al., 1989; Holmes & Lai, 1996), o que pode gerar resultados falsos negativos, além de não permitir a diferenciação de amostras idênticas neste gene. Sendo assim, procurou-se por meio deste estudo avaliar essa região do gene N altamente conservada por RFLP de modo a classificar as amostras brasileiras por esta região genômica viral.

2. OBJETIVOS

Avaliar o uso de uma RT-PCR "universal" (porção mais conservada do gene da proteína N) na confirmação de amostras de campo de VBIG isoladas no Estado de Minas Gerais.

Analisar por RFLP os produtos de RT-PCR (porção mais conservada do gene da proteína N) na classificação de amostras de campo de VBIG isoladas de surtos de BIG no Estado de Minas Gerais.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. HISTÓRICO

O primeiro relato da doença causada pelo VBIG foi feito por Schalk & Hawn em 1931, no estado da Dakota do Norte, EUA, sendo, posteriormente, o agente etiológico determinado em 1936 e isolado por inoculação, via cavidade alantóideia, em OEG/SPF em 1937 (Cavanagh & Naqi, 1997). Inicialmente, pensava-se ser o agente etiológico pertencente a uma única amostra viral - a 82828, denominada sorotipo Massachusetts (M41), isolada no estado americano de mesmo nome por Van Roekel, em 1941. Entretanto, em 1946, foi isolada outra amostra de VBIG (A5968 - Conn46), não relacionada sorológica e patogenicamente ao primeiro sorotipo, sendo denominado de sorotipo Connecticut (Cavanagh & Naqi, 1997). Contudo, até a década de 60, acreditava-se ter este vírus tropismo somente pelo trato respiratório, o que foi contradito pela associação da síndrome nefrite-nefrose em aves com o VBIG, tanto nos EUA (Winterfield & Hitchner, 1962) quanto na Austrália (Cumming, 1963).

No Brasil, o quadro respiratório da doença foi diagnosticado em 1957, no Estado de Minas Gerais (Hipólito, 1957), com o isolamento viral

em OEG/SPF e, o renal, somente em 1973, no Estado de São Paulo (Hipólito, 1973). Devido à constatação da ampla disseminação da doença em todo o país, o Ministério da Agricultura lançou em janeiro de 1980 uma portaria permitindo a utilização da vacina contra o VBIG oriunda da amostra Holland (atenuada ou inativada, sorotipo Massachusetts), baseado nos bons resultados obtidos com a mesma em outros países e na maior prevalência desta nos mesmos. No Brasil os resultados não foram tão satisfatórios, apesar da redução significativa dos problemas associados à doença (Wentz, 1988; Di Fábio, 1993).

Anteriormente à introdução dessas vacinas e após, 15 amostras do VBIG (as mesmas do presente estudo) foram isoladas no Estado de Minas Gerais, sendo duas delas estudadas quanto à patogenicidade comparada em aves gnotobióticas e SPF (Resende, 1983) e as 15 com relação à atividade hemaglutinante após o tratamento com fosfolipase C tipo I (Paniago, 1994). As relações antigênicas entre amostras de referência e os 15 isolados foram analisados com anticorpos monoclonais em ELISA (Souza, 1999) e testes de neutralização cruzada com algumas delas em cultivos de anéis de traquéia (CAT) (Epiphany, 1998), demonstrando a presença de amostras distintas da amostra vacinal. Estas 15 amostras foram caracterizadas como VBIG por RT-PCR pela amplificação de parte do gene S2 (Resende et al., 1998).

A presença de novos sorotipos tem sido descrita nos Estados de São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, em diferentes sistemas de criação (Wentz, 1988; Di Fábio, 1993; Lunge et al., 1998; Ikuta, 1999).

A importância econômica e científica da BIG vêm sendo demonstradas há décadas, sem no entanto chegar a um consenso quanto ao diagnóstico e controle. Na década de 80, a BIG foi a principal causa de mortalidade em frangos de corte e condenação na linha de abate, chegando a índices superiores a 10%, nos EUA. No Brasil, na mesma época, estimou-se uma perda de 15 milhões de frangos condenados anualmente por lesões no sistema respiratório (Lamas da Silva, 1988) e a prevalência de 6,7 e 8,7%, em 1987 e 1988 respectivamente, do vírus em Minas Gerais, sendo considerada a segunda doença viral mais freqüente em plantéis

avícolas (Lamas da Silva, 1989). Nos estados do sul do país, foram registrados, pelo Ministério da Agricultura, entre 1986 e 1995, 169.499 casos e 68 focos no Paraná, sendo 15.043 casos e 17 focos no ano de 1995. Em Santa Catarina, nenhum caso e foco foi registrado neste período mas, no ano de 1990 foram detectados 7000 casos no Rio Grande do Sul. No Uruguai, a BIG foi detectada pela primeira vez no ano de 1995, sendo considerada enzoótica na Argentina (Weiblen, 1996). Nos EUA, entre 1991 e 1997, a BIG foi considerada a principal doença diagnosticada e responsável por perdas econômicas em plantéis avícolas, segundo levantamentos realizados pelo US Animal Health Association's Transmissible Diseases of Poultry e USDA-FSIS (Smith, 1998).

3.2. A DOENÇA

A BIG é uma enfermidade viral altamente contagiosa, de caráter agudo, sendo exclusiva de galinhas (*Gallus gallus domesticus*), independente de sexo, linhagem e idade, sendo mais severa em pintos, causando alguma mortalidade (Saif, 1993; Cavanagh & Naqi, 1997).

O período de incubação pode variar de 18 a 36 horas dependendo da dose e da via de inoculação e de 48 horas a 11 dias em infecções naturais (Cavanagh & Naqi, 1997). A transmissão dá-se a partir de aves doentes para susceptíveis, por contato direto ou indireto (Cumming, 1970; Wit et al., 1998), podendo ocorrer durante qualquer estágio respiratório da doença (Hipólito et al., 1979). O VBIG foi resolidado das tonsilas cecais e fezes até 14 e 20 semanas, respectivamente, após a infecção (Alexander & Gough, 1977). A natureza da persistência da infecção pelo VBIG permanece não definida (Cavanagh & Naqi, 1997). Experimentalmente, esse pode ser transmitido prontamente por inoculação intranasal, intratraqueal (Beaudette & Hudson, 1937) e intramuscular, não se verificando o mesmo pela via subcutânea (Hipólito et al., 1979). Vetores não parecem ser importantes na difusão do vírus (Cavanagh & Naqi, 1997).

As amostras do VBIG apresentam diferenciação quanto à sua virulência e tropismo, mas todas são capazes de multiplicar-se no aparelho respiratório, o que não acontece com outros

órgãos mesmo após seriadas passagens do vírus nestes. Sendo assim, o sítio inicial de multiplicação do VBIG é o sistema respiratório (Otsuki et al., 1990; McMartin, 1993; Bhattacharjee & Jones, 1997; Cavanagh & Naqi, 1997; Villegas, 1997).

A doença apresenta diferentes quadros clínicos que variam de acordo com o tipo de criação e a amostra envolvida (Resende, 1983). Os sinais respiratórios em pintos são caracterizados por ofego, tosse, espirro, ruídos traqueais e exsudação nasal, sendo o último ausente e a doença mais branda ou difícil de ser notada em aves com seis semanas ou adultas. As aves doentes apresentam-se deprimidas, com redução do consumo de alimento e do ganho de peso, podendo em alguns casos apresentar anorexia e diarreia. Entre as principais lesões destacam-se: aerossaculite, rinite, traqueíte, sinusite, conjuntivite, lacrimejamento aumentado e pneumonia. Em frangos de corte, a doença adquire principalmente caráter respiratório. A BIG pode ser exacerbada pela presença de outros vírus (adenovírus, reovírus e vírus da doença de Gumboro) e bactérias (*Mycoplasma gallisepticum*, *M. synovae* e *Escherichia coli*), causando também alta condenação em abatedouro devido a lesões do sistema respiratório e órgãos adjacentes (DCR – doença crônica respiratória, perihepatite, pericardite, peritonite e pneumonia) (Whiteman & Bickford, 1989; McMartin, 1993; Cavanagh & Naqi, 1997)

Algumas amostras do VBIG são nefrotropicas, como a T Australiana, as americanas Gray, JMK, Holte, MW 34c e algumas do sorotipo Massachusetts, induzindo a um quadro renal que pode ser acompanhado de sinais respiratórios, resultando em alta mortalidade (até 30%) com aumento do volume dos rins, acúmulo de uratos no parênquima desses e ureteres, nefrite, nefrose, coloração renal anormal, depressão, penas arrepiadas, sede aumentada, diarreia e desidratação. Os pintinhos machos são duas vezes mais susceptíveis do que as fêmeas, em relação a essas amostras (McMartin, 1993; Chen et al., 1996; Cavanagh & Naqi, 1997; Villegas, 1997).

Em poedeiras, é comum uma queda da produção de ovos de até 25% e também da qualidade interna e externa destes. A severidade do

declínio da produção de ovos pode variar com o período de postura e com a amostra viral. É freqüente o aparecimento de ovos com casca rugosa ou mole, sem casca, pequenos e de clara aquosa. A produção pode retornar ao normal após 6 a 8 semanas pós-infecção mas, geralmente, isso não ocorre. Pintinhas de postura infectadas precocemente podem apresentar atrofia ou mal formação do oviduto, resultando em "falsas poedeiras" ou num plantel que nunca atinge os níveis esperados de produção (Whiteman & Bickford, 1989; McMartin, 1993; Cavanagh & Naqi, 1997; Villegas, 1997). O efeito do VBIg sobre o sistema reprodutivo do macho não tem sido relatado. A mesma sintomatologia citada acima, associada a processos entéricos com intensa diarreia, têm sido causada por amostras enterotrópicas, como a amostra G, D207, HS-91 e variantes do Connecticut (Conn 46) (Ambali & Jones, 1990; Karaca et al., 1990; Dhinakar Raj & Jones, 1997; Uenaka et al., 1998).

Na Grã-Bretanha, uma nova amostra foi isolada (4/91 ou 793/B) de frangos e reprodutoras de corte com um aumento repentino na taxa de mortalidade, sobretudo nas fêmeas, sinais respiratórios, queda na produção e postura de ovos com casca despigmentada e deformados, além de tremores musculares. As lesões incluíam miopatia bilateral do peito, congestão dos folículos ovarianos e traqueíte (Gough et al., 1992). Quadros de diarreia em frangos com 14 dias de vida também foram documentados, demonstrando ser, também, enterotrópica. Mas ao contrário das outras amostras de VBIg, foi rapidamente eliminada do trato respiratório em frangos com 6 semanas de idade (Dhinakar & Jones, 1996, 1997). Atualmente esta nova amostra já foi isolada na maioria dos países europeus, sendo observada sua presença em outros através de levantamento sorológico (Villegas, 1997).

3.3. ETIOLOGIA E BIOLOGIA MOLECULAR DO VBIg

O VBIg é um integrante da família *Coronaviridae*, gênero *Coronavirus*, único representante do grupo antigênico III, sendo envelopado, pleomórfico, geralmente arredondado, com diâmetro médio variando entre 80 e 120 nm. As projeções superficiais em forma de pétalas (17 – 20 nm de comprimento)

que rodeiam o vírion (Whiteman & Bickford, 1989; Murray et al., 1992; McMartin, 1993; Cavanagh & Naqi, 1997; Lai & Cavanagh, 1997) conferem a este um aspecto de coroa solar, daí a denominação corona (Figura 1).

Seu genoma é composto por um longo RNA de fita simples, não segmentado, de polaridade positiva (sendo infeccioso), com coeficiente de sedimentação de 64S e comprimento de 27,6 kb (kilobases) (amostra Beaudette), com genes dispostos na ordem 5' - S - sM - M - N - 3' e apresentando entre estes, genes não estruturais e não essenciais (Figura 2) (Lomniczi, 1977; Bournnell et al., 1987; McMartin, 1993; Holmes & Lai, 1996; Cavanagh & Naqi, 1997; Lai & Cavanagh, 1997). Em sua extremidade 5', o genoma apresenta-se capeado e contendo uma seqüência "leader" de 65 a 80 nucleotídeos - também presente na mesma região dos RNAm_g (RNA mensageiro subgenômico) - seguida por uma UTR ("untranslated region") de 200 a 400 nucleotídeos, a qual está envolvida na regulação da expressão do RNAm 1. Na extremidade 3' encontra-se uma UTR de 200 a 500 nucleotídeos, seguida pela cauda de poli A (Brown et al., 1984; 1986; Stern & Sefton., 1984; Lai & Cavanagh., 1997; Liu et al., 1998).

O mecanismo de replicação do VBIg envolve a produção de um RNAm (RNA mensageiro) e cinco subgenômicos através da transcrição descontínua ("leader - priming") ou os RNAm_g funcionando como "replicons", sendo estas regiões internas 3'co-terminais do genoma inteiro (Figura 2) (Stern & Sefton., 1984; Bredenbeck et al., 1987; Sethna et al., 1990; 1991; Yokomori et al., 1992; Jeong & Makino., 1992; 1994). Somente a região 5', que está ausente no próximo RNAm menor, é traduzida ativamente nos RNAm_g, por uma RNA polimerase dependente de RNA viral (Stern & Sefton, 1984; Bournnell et al., 1987; Zhao et al., 1993; Cavanagh et al., 1993; Lai & Cavanagh, 1997), a qual é codificada por parte do RNAm 1, que corresponde ao genoma viral completo (fita negativa). Este apresenta duas ORFs ("open reading frames" - janela aberta de leitura) (1a e 1b) que se sobrepõem (Brown et al., 1986; Brierley et al., 1987; Bournnell et al., 1987; Lai & Cavanagh., 1997).

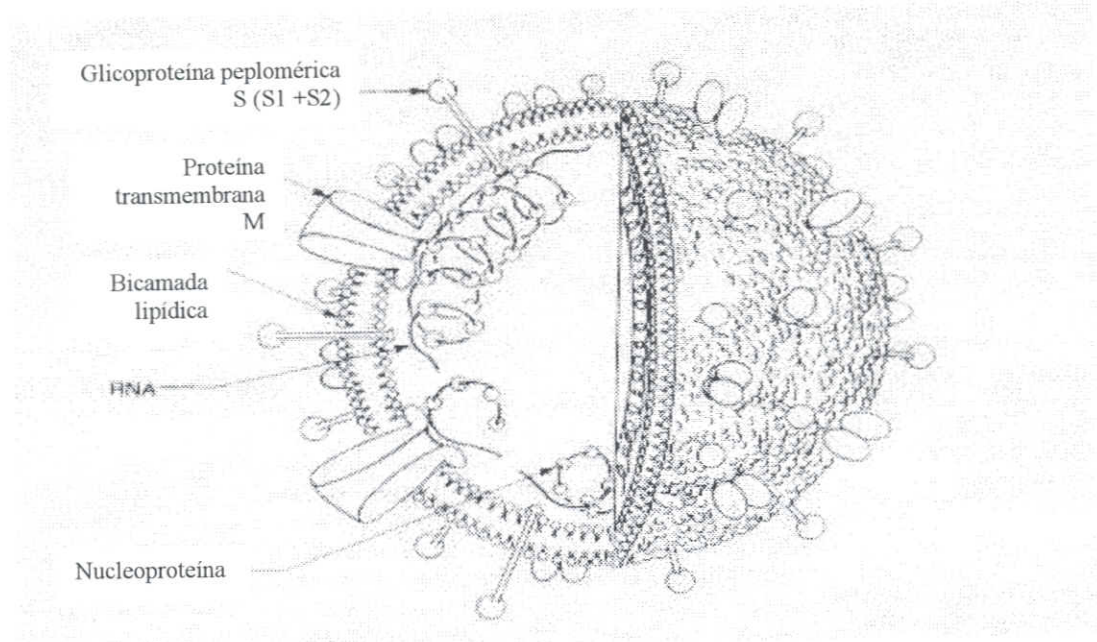


Figura 1 - Morfologia esquemática do coronavírus.
Fonte: Murray et al., 1992.

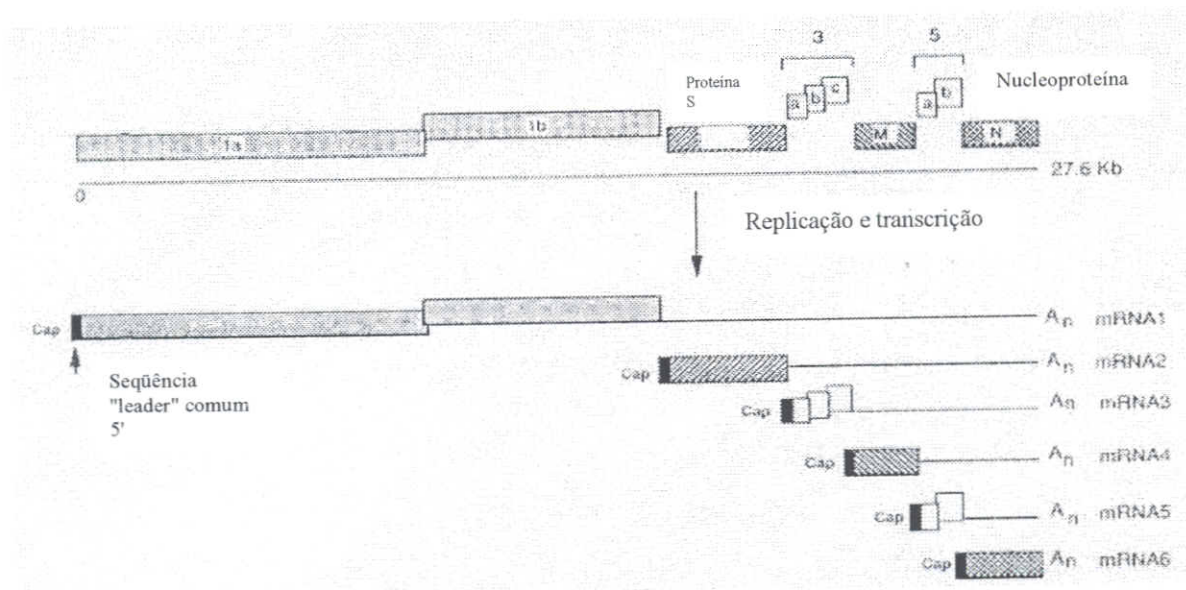


Figura 2 - Genoma do VBIQ e representação do esquema de replicação viral.
Fonte: Liu & Inglis, 1991.

Igualmente ao RNAm 1, os RNAm 3 e 5 são funcionalmente policistrônicos, sendo compostos por três ORFs (3a, 3b e 3c) e duas ORFs (5a e 5b), respectivamente. A função destas ORFs não está ainda bem determinada. Com exceção da proteína sM (pequena proteína hidrofóbica - associada à membrana) a qual é codificada pela ORF 3c, as demais proteínas não são estruturais, sendo a 3b e a 5b as mais conservadas entre amostras de VBIG (Boursnell & Brown, 1984; Boursnell et al., 1985 b; Smith et al., 1987; Liu et al., 1991; Liu & Inglis, 1991; 1992a, b; Jia & Naqi, 1997).

Por outro lado, os RNAm 2 [\cong 3488 pb (pares de bases)], 4 (\cong 677 pb) e 6 (\cong 1230 pb), são funcionalmente monocistrônicos, codificando as principais proteínas estruturais, sendo essas a da espícula (S \cong 180 kDa), a da membrana (M \cong 23 a 36 kDa) e a do nucleocapsídeo (N \cong 56 kDa), respectivamente (Cavanagh, 1981; Stern & Sefton, 1982b; 1984; Boursnell et al., 1987; Saif, 1993). A da espícula é um glicopolipeptídeo rico em oligossacarídes ligados a região amino terminal, constituindo as projeções superficiais do vírion, em forma semelhante a de um pirulito. Este é composto por duas subunidades: S1 (520 aminoácidos e 90 kDa) e S2 (625 aminoácidos e 84 kDa), em duas a três cópias cada, ligadas por pontes dissulfídicas, sendo a primeira globular e correspondente à metade amino terminal, formando o topo desta projeção (peplômero) e encontrando-se aderida à segunda subunidade (S2) a qual possui a forma de bastão e por sua vez é ligada à membrana lipídica e, portanto, estando parte inserida nesta. Enquanto a proteína S2 apresenta alta homologia de aminoácidos entre amostras do VBIG (93% entre M41 e Beaudette) e 30% entre os coronavírus em diferentes grupos antigênicos, S1 é extremamente variável, chegando a 52% de variação entre as amostras M41, UK6/82 e D1466 (Holmes & Williams, 1990; Cavanagh & Davis, 1992; Holmes & Lai, 1996).

A importância da proteína S reside no seu envolvimento com a ligação do vírus às células e fusão do envelope viral com as membranas celulares, sendo a subunidade S1 indutora de anticorpos inibidores da hemaglutinação (IH) e vírus neutralizantes (VN), além de ser alvo de anticorpos monoclonais neutralizantes (MAbs)

(Mockett et al., 1984; Cavanagh & Davis, 1987; Niesters, 1987; Koch et al., 1990; Laude, 1990; Holmes & Williams, 1990; Moore et al., 1997). Entretanto, o nível de anticorpos VN e IH não apresentou correlação com a proteção frente ao desafio, demonstrando estarem outros fatores envolvidos na criação da imunidade protetora (Ignjatovic & Galli, 1994 a, b).

Contrariamente, a glicoproteína M não apresenta importância na determinação de sorotipos e nem na indução de resposta imune protetora, sendo a menos imunogênica (Ignjatovic & Galli, 1994 a, b). No entanto, Collins et al. (1982) e Laviada et al. (1990), demonstraram que alguns destes anticorpos podem neutralizar partículas virais mas somente na presença de complemento. Esse glicopolipeptídeo, também, apresenta oligossacarídes ligados a região amino terminal, sendo seu peso molecular determinado pelos diferentes graus de glicosilação (Stern & Sefton, 1982 a, b; Stern et al., 1982). Em sua constituição, encontram-se 225 - 230 aminoácidos, estando em torno de 20 expostos na superfície viral e correspondendo aos principais sítios antigênicos da proteína (Rottier et al., 1986; Laude, 1990). Esta é responsável pela determinação do sítio de "brotamento" nas membranas intracelulares (Klumperman et al., 1994), interação com o nucleocapsídeo e RNAr (Sturman et al., 1980), indução de interferon α (IFN α) (Laude, 1990; Baudoux et al., 1998), agrupamento das partículas virais, além de ser essencial para a formação do envelope (Holmes & Williams, 1990; Holmes & Lai, 1996; Nguyen & Hogue, 1997; 1998; Haan et al., 1998). Tanto o gene quanto a proteína M são altamente conservados entre as amostras de VBIG, apresentando importância nos estudos relacionados à recombinação natural entre diferentes sorotipos de VBIG (Cavanagh & Davis, 1992).

Diferentemente das outras proteínas do VBIG, a do nucleocapsídeo não é glicosilada, constituindo numa fosfoproteína de 409 aminoácidos, que envolve e se liga ao RNA viral, formando a ribonucleoproteína, a qual é helicoidal, com 14-16 nm de diâmetro, sendo evidenciada por tratamento do vírion com diversos detergentes, isolamento através de gradiente de densidade de sacarose e visualização por coloração negativa e com

carbono/platina (Bingham & Almeida, 1977; Macnaughton & Davies, 1978; Lamontagne et al., 1981; Davies et al., 1981). A interação entre a nucleoproteína e o RNA viral é vírus específica, acontecendo, possivelmente, durante a infecção e localizada nas seqüências "leader" na extremidade 5' (Baric et al., 1988; Stohlman et al., 1988) e na UTR da extremidade 3' do RNA viral (Collisson et al., 1995; Zhou et al., 1996). Postulou-se, portanto, que esteja envolvida na modulação da síntese de RNA viral, já que essa é uma das funções da UTR (Liu et al., 1998). Certas regiões do RNA genômico e subgenômicos envolvidas na montagem do vírion também ligam-se a nucleoproteína (Cologna & Hogue, 1998). Tal interação nucleoproteína:RNA é facilitada pela característica básica desta, sendo também rica em resíduos de serina que atuam como sítios de fosforilação (Sapats et al., 1996). Além disso, apresenta-se associada à proteína que constitui a RNA polimerase viral, promove proteção parcial do genoma viral frente as RNases intracelulares e, juntamente com a proteína M, está envolvida no agrupamento e brotamento das partículas virais no compartimento entre o retículo endoplasmático rugoso e o complexo de Golgi (Sturman et al., 1980; Masters & Sturman, 1990; Anderson & Wong, 1993), sendo produzida em grandes quantidades durante a replicação na seguinte proporção molar: 1 (S): 6 (M): 15 (N) (Cavanagh, 1983).

Outra particularidade é a alta variabilidade da nucleoproteína, tanto em tamanho quanto em composição, entre diferentes coronavírus, chegando em torno de 71% a diferença entre o VBIG, o vírus da gastroenterite transmissível suína e o coronavírus bovino (Boursnell et al., 1985 a; Lapps et al., 1987; Williams et al., 1992). Por outro lado, esta é a que apresenta maior grau de conservação dentro dos grupos antigênicos do gênero *Coronavirus*, quando comparada as outras proteínas estruturais (S1, S2, M e sM) e não estruturais do vírion. A nucleoproteína possui uma homologia variando de 94,4 a 98,3% entre as amostras Beaudette, M41, KB8523 (japonesa), Gray e Ark-99. A ORF do RNAm₆ apresenta também alta homologia entre diferentes amostras do VBIG sendo esta de 91,1 a 96,5% entre as amostras Gray, Ark-99, H-52 e de outros dados de sequenciamento de diversas amostras de VBIG (Boursnell et al., 1985 a; Collisson et al., 1990

b; Williams et al., 1992). Por tais motivos, o gene que codifica a nucleoproteína seria de grande valia para o diagnóstico do vírus. Além disso, esta característica facilita o estudo de similaridade de amostras pertencentes a sorotipos muito distintos, permitindo a formação de grandes grupos (Ikuta, 1999).

Embora a nucleoproteína não tenha um envolvimento na prevenção da replicação do vírus na traquéia e rins, ela foi a proteína mais imunogênica e induziu altos títulos de anticorpos em galinhas vacinadas, os quais foram titulados pelo teste de ELISA após duas imunizações. No entanto, anticorpos VN e IH não foram detectados nem após a quarta imunização (Ignjatovic & Galli, 1994 a, b). Contrariamente, outros autores encontraram atividade VN com MAbs dirigidos para a nucleoproteína de VBIG e MHV (*Murine hepatitis virus* - vírus da hepatite murina - coronavírus) (Nakanaga et al., 1986; Case et al., 1988; Boots et al., 1992). Estudos recentes têm demonstrado que a nucleoproteína carrega determinantes antigênicos para as células T citotóxicas e T helper, sugerindo o envolvimento da imunidade mediada por células em infecções por coronavírus e também indicando uma possível importância na cooperação entre estes dois tipos celulares. Além disso, estes determinantes antigênicos podem ser partilhados entre amostras heterólogas de VBIG, resultando na indução de proteção cruzada entre tais "protectotipos". Tal fato foi confirmado pelo achado destes para hibridomas de células T na seqüência de aminoácidos 71-78 da nucleoproteína de diversas amostras do VBIG (Darbyshire, 1981; Boots et al., 1990; 1991 a, b; Seo & Collisson, 1997). Outro determinante reconhecido por células T citotóxicas de pintos infectados pelo VBIG foi demonstrado por Seo et al. (1997) e Seo & Collisson (1998) sendo este localizado na região carboxi-terminal de 120 aminoácidos da nucleoproteína. O estudo empregou a expressão do polipeptídeo em células CK (células renais de pinto SPF) infectadas pelo vetor SFV (vírus Semliki Forest) e inoculação *in vivo* de DNA plasmidial expressando o fragmento de interesse. Este procedimento foi suficiente para induzir imunidade e proteger os pintos frente a um desafio com duas amostras de VBIG sorologicamente distintas. Além disso, reduziu a infecção nos pulmões em 7 log₁₀ e a eliminou

dos rins, num quadro de BIG aguda. Conseqüentemente, tais determinantes antigênicos poderiam ser úteis como componentes de vacinas contra o VBIg.

3.4. NOVAS VARIANTES

A despeito dos vários estudos publicados até o momento, os mecanismos envolvidos no alto grau de geração de novas variantes do VBIg ainda permanecem desconhecidos. Esta tem sido explicada pela provável facilidade da transcrição ter uma taxa de erro relativamente alta (10^{-3}) durante a cópia do molde de RNA e ausência de um mecanismo de revisão da leitura (Steinhauer et al., 1976, citado por Kusters et al., 1989). A geração de novas variantes do VBIg pode ser devida a mutações pontuais como também por recombinações de grandes fragmentos do RNA e em múltiplos genes do vírus, sendo que a antigenicidade deste não é alterada quando os genes envolvidos não são os que codificam a proteína S1 (Cavanagh & Davis, 1992; Jia et al., 1995).

Um achado interessante é que a recombinação do vírus da hepatite murina (MHV) é comum e ao acaso, estando situada em determinados sítios ou "hot spots" do genoma. No entanto, somente alguns recombinantes são selecionados, ao invés de ocorrer a restrição do processo de recombinação, como se pensava anteriormente. Por serem estes "hot spots" localizados em regiões hipervariáveis, propõem-se serem estes domínios protéicos mais tolerantes às modificações estruturais (Banner & Lai, 1991). A mesma proposta foi concebida por Cavanagh & Davis (1992) e Cavanagh et al. (1998), os quais sugerem não ser a taxa de mutação alta e sim ocorrendo em sítios imunologicamente tolerados que se acumulam ao longo do tempo, não somente em S1 como também nas outras proteínas. Contudo, esta pode ser mais rapidamente realizada frente à pressão seletiva imposta pelo sistema imune e, ou por balanço populacional de vírus entre os diferentes sorotipos ou amostras prevalentes na região. Neste caso, a nova amostra preenche o vazio ambiental deixado pela outra.

Também é importante para a emergência de novas variantes no campo a recombinação entre amostras vacinais (Niesters, 1987; Cavanagh et al., 1990; Jia et al., 1995). Não somente a ampla

utilização de vacinas, como também o transporte de animais infectados por longas distâncias pode ter contribuído para tal seletividade (Cavanagh & Brown, 1990).

Outro tipo de mutação encontrada no VBIg é a deleção, sendo um dos produtos originados chamados de RNAs interferentes defectivos (DI-RNA), onde o vírus CD91 é um mutante que ocorre naturalmente na amostra Beaudette. Através desse procedimento, tem sido possível o estudo *in vitro* dos mecanismos e regiões envolvidas na replicação, transcrição e "montagem" do RNA viral (Jeong & Makino, 1992; Fosmire et al., 1992; Pénczes et al., 1994; 1996; Stirrups et al., 1998; Dalton et al., 1998; Kim et al., 1998).

O DI-RNA como também os RNAm_{sg} podem contribuir para o processo de criação de novas variantes do VBIg, já que servem como molde ("template") para a RNA polimerase, tão bem quanto o RNA genômico e por serem incorporados em partículas virais nas quantidades de um virion com DI-RNA em 10 completos e de um com RNAm_{sg} em três vírions completos da amostra Beaudette e 20 vírions da M41 (Cavanagh et al., 1993; Pénczes et al., 1994).

3.5. DIAGNÓSTICO

Como os sinais clínicos da BIG são semelhantes àqueles causados por outros patógenos aviários, é necessário, portanto, o diagnóstico diferencial (Ignjatovic & Ashton, 1996). Este, como na maioria das doenças virais, é baseado no isolamento e identificação do vírus, sendo o primeiro realizado em OEG/SPF ou cultivo de órgãos (anéis traqueais) de aves SPF. No entanto, tais testes são laboriosos e demorados quando em uso rotineiro, muitas vezes necessitando de adaptação da amostra ao cultivo em OEG, através de sucessivas passagens cegas ou confirmação do diagnóstico por inoculação intra-traqueal em pintos SPF com a amostra viral ou líquido alantóideo da primeira passagem em OEG, observando o início dos sinais clínicos característicos em torno de 18 a 36 horas após infecção e lesões *post-mortem* (Hipólito et al., 1979; Whiteman & Bickford, 1989; Cavanagh & Naqi, 1997).

Os sorotipos do VBIG têm sido identificados com base nos testes de vírus-neutralização medidos pela dose letal (DL_{50}) associada às alterações sugestivas no embrião (nanismo, enrolamento, etc) em OEG/SPF (Karaca et al., 1990; Gelb et al., 1991), por redução das placas em cultivo celular (podendo ser utilizadas células renais, pulmonares e hepáticas de embriões de galinha SPF com 15 a 18 dias de incubação, crescendo também em células VERO) (Coria & Richtie, 1973; Cowen & Hitchner, 1975) e por redução do movimento ciliar em cultivo de cortes de anéis de traquéia de embriões de galinha SPF (Cherry & Taylor-Robison, 1970; Darbyshire et al., 1979; Cook, 1984; Dhinakar Raj & Jones, 1996; Epiphany, 1998). Outros testes utilizados para a mesma finalidade, como também para a simples identificação do vírus e monitoração sorológica do lote, têm sido encontrados numa vasta literatura a respeito, sendo estes: IH (Alexander et al., 1976; Lashgari & Newman, 1982; Holmes & Finney, 1985), imunofluorescência (Ambali & Jones, 1990; Bhattacharjee et al., 1994), imunodifusão em ágar gel (Witter, 1962; Villegas & Avellaneda, 1992), fixação de complemento (Marquardt, 1974), ELISA (Marquardt et al., 1981; Mockett & Darbyshire, 1981; Karaca et al., 1990; Sander et al., 1997; Cardoso et al., 1997; 1998; Erbeck & McMurray, 1998; Ndifuna et al., 1998; Montassier et al., 1998; Souza, 1999) e imunohistoquímica (Janse et al., 1994; Chen et al., 1996). Apesar de serem muito utilizados na prática, tais testes têm levado a resultados conflitantes quanto às afinidades e diferenças entre as amostras, gerando, freqüentemente, dados inconclusivos e podendo omitir novos sorotipos ou variantes. Além disso, são laboriosos e é comum haver uma demora considerável entre o surto da doença e a confirmação laboratorial, dificultando o planejamento e execução de medidas de controle (Zwaagstra et al., 1992; Kwon et al., 1993 a; Ignjatovic & Ashton, 1996; Falcone et al., 1997; Handberg et al., 1999).

Embora o diagnóstico sorológico seja útil em certos casos, é importante que os resultados sejam corretamente interpretados, pois as inúmeras amostras do VBIG compartilham vários antígenos com pequenas diferenças, que resultam na observação de reações cruzadas entre diversos sorotipos. Portanto, o fato de se

detectar a presença de anticorpos contra um sorotipo não indica necessariamente a presença deste nas aves da granja ou região. Em geral, aves adultas que receberam várias vacinações com um mesmo sorotipo possuem níveis baixos de anticorpos que pertencem a sorotipos contra os quais nunca foram vacinadas (Villegas, 1997).

Atualmente, têm sido realizados diversos estudos com MAb's específicos para as proteínas S, M e N para detecção e classificação das amostras do VBIG (Naqi et al., 1993; Bonnefoy et al., 1994; Ignjatovic & McWatters, 1991; Ignjatovic & Ashton, 1996; Ignjatovic et al., 1997; Moving et al., 1998), com sucesso. Por outro lado, diversas amostras de VBIG não foram neutralizadas por MAB's dirigidos contra S1 (Kusters et al., 1989) e N (Sapats et al., 1996), sendo, então, necessária a criação de um painel bem amplo de MAB's para aumentar a confiabilidade do teste, já que cada MAB reconhece somente um determinante antigênico. (Ignjatovic & McWatters, 1991).

Métodos de hibridização *in situ* com DNA recombinante foram desenvolvidos para a detecção viral, como também técnicas de immunoblotting (*Western blot*, *Northern blot*, *Southern blot* e *Dot blot*) (Stern & Sefton, 1984; Collisson et al., 1990 a; Jackwood et al., 1992; Zhao et al., 1993; Péntzes et al., 1994; Ignjatovic et al., 1997; Ndifuna et al., 1998). Karaca et al. (1990), através de "fingerprints" (impressão digital) de oligonucleotídeos resistentes a RNase T1, conseguiram caracterizar três isolados entéricos do VBIG como sendo mutantes do sorotipo Connecticut (Conn 46), estando tais mutações aparentemente localizadas na proteína S1. A mesma técnica foi anteriormente utilizada por Kusters et al. (1989) para indicar diferenças na filogenia do VBIG devido a recombinação gênica de amostras virais. Embora tais sistemas sejam sensíveis, específicos e reproduzíveis, são difíceis de serem aplicados para uma grande quantidade de amostras, além de serem trabalhosos (Lin et al., 1991) e requererem grandes quantidades de partículas virais altamente purificadas (Zwaagstra et al., 1992).

A técnica de PCR, desenvolvida em 1985, consiste basicamente no reconhecimento e na amplificação repetitiva, por uma DNA

polimerase termoestável, de um segmento de DNA, mediante sondas de oligonucleotídeos. No caso do material estudado ser RNA, é necessário que este sofra primeiro uma transcrição para cDNA (DNA complementar), através da enzima transcriptase reversa, passando o teste a ser chamado de RT-PCR. Entre as inúmeras vantagens frente aos testes anteriormente citados encontram-se a alta especificidade, sensibilidade, versatilidade e rapidez (Saiki, 1989; Wolcott, 1992; Pfeffer et al., 1995; Blum, 1996; Ieven & Goossens, 1997).

Com o objetivo de classificar ou tipificar as amostras do vírus, vários estudos foram realizados por RT-PCR e análise com RFLP sobre parte ou gene completo da proteína S1 (Kwon et al., 1993 a; Adzhar et al., 1996; 1997; Jackwood et al., 1997; Song et al., 1998) e S2 (Lin et al., 1991). Porém, por ser S1 altamente variável muitas amostras não foram amplificadas, demonstrando não ser segura a utilização desta região genômica para diagnóstico por RT-PCR. Apesar do gene que codifica a proteína S2 ser mais conservado que a da S1, este ainda apresenta menor homologia entre diferentes amostras de VBIG se comparado a do gene N (Cavanagh & Davis, 1992; Holmes & Lai, 1996), podendo gerar falsos negativos.

Sendo assim, Zwaagstra et al. (1992) propuseram oligonucleotídeos que reconhecessem a porção amino terminal do gene N, gerando um produto amplificado de 438 pb de 18 isolados do VBIG (15 da Holanda, dois dos EUA e um do Oriente Médio), os quais foram posteriormente hibridizados e seqüenciados, comprovando que as bandas específicas continham a região alvo esperada. O posicionamento de seus oligonucleotídeos foi baseado no estudo realizado por Bournsnel et al. (1985a), os quais promoveram o seqüenciamento de todo gene N das amostras M41 e Beaudette pelo método dideoxi, dos insertos clonados em pBR 322 e reclonados em M13. A homologia encontrada entre as duas amostras foi extremamente alta, tanto nas ORF's quanto nas regiões não codificadoras de proteína, chegando a até 99 % nesta última, onde somente três entre 315 bases apresentaram mudanças. Na ORF (1230 pb) somente 87 eram diferentes, geralmente alterações purina/purina

e pirimidina/pirimidina, que resultaram em 23 aminoácidos modificados, a maioria das quais de natureza conservadora. O maior grau de homologia nesta região ocorreu entre os aminoácidos 50 e 150 das seqüências do VBIG, estando situada justamente no segmento genômico escolhido para o presente estudo. A única diferença marcante entre as duas amostras encontra-se na porção 3' terminal (UTR) deste RNAm_{sg}, sendo constituído de 184 pb adicionais na amostra Beaudette, distintas do restante da seqüência e, provavelmente, inserido em algum momento de sua história, no processo de alta adaptação a OEG/SPF. A mesma seqüência, porém, foi detectada nas amostras Ark-99, Gray, Conn, JMK, SE-17 e a japonesa KB 8523, apresentando 67,4 a 94,6% de similaridade entre estas. Por outro lado, as amostras M41, Australia "T" e Holland 52 (H-52) não a continham. A sua função permanece desconhecida, acreditando estar envolvida no processo de transcrição (Shizuyo et al., 1988; Collisson et al., 1990 b).

Posteriormente, Williams et al. (1992) confirmaram os achados anteriores quanto à alta homologia do gene N entre amostras do VBIG e verificaram a presença de mais duas regiões altamente conservadas, as quais estão localizadas nas porções de 730 a 800 e de 1138 a 1166. Essas foram demonstradas através do alinhamento das seqüências de N obtidas das amostras Gray, Ark-99, H-52, dados de seqüenciamento do VBIG e de outros coronavírus, publicados anteriormente. Contudo, sua utilização como regiões adequadas para anelamento de oligonucleotídeos visando a detecção do VBIG não foi ainda testada.

Baseando-se na mesma região utilizada por Zwaagstra et al. (1992), mas com oligos diferentes deste, sete amostras de referência adaptadas ao OEG/SPF, uma a linhagem celular VERO e 12 de espécimes clínicos ("pool" de traquéia, pulmões, rins e tonsilas cecais) de frangos não vacinados com problema respiratório agudo, foram detectadas tanto com oligos externos como internos à seqüência de interesse, sendo o tamanho dos fragmentos gerados de 316 pb e 240 pb respectivamente (Falcone et al., 1997).

Baseado no mesmo gene, mas com oligonucleotídeos direcionados para uma região

genômica compreendida entre as posições 349 e 802 do gene N, Handberg et al. (1999) conseguiram detectar 12 amostras (cinco americanas e sete européias) no líquido alantóideo de OEG/SPF infectados com o VBIg e em média 82% (variação de 67%-100%) de preparações de tecido traqueal de galinhas White Leghorn SPF (5 - 6 semanas de idade) experimentalmente inoculadas via intra-traqueal. Estas aves apresentavam um quadro respiratório agudo, sendo as amostras coletadas três dias pós-inoculação. Os autores postularam ser esta variação de detecção do gene N em amostras clínicas derivada do tropismo diferenciado das amostras do VBIg, já que somente a traquéia foi coletada. Além disso, a RT-PCR foi comparada com a técnica de imunohistoquímica, sendo mais sensível, apesar destas apresentarem boa correlação de resultados.

Na mesma linha de pensamento, Andreasen et al. (1991) desenvolveram oligonucleotídeos localizados na terminação 5' do gene N e 3' do gene M da amostra Beaudette, originando um produto amplificado de 1020 pb, o qual foi seqüenciado e concordou com a seqüência previamente publicada (Bournsnel et al., 1985 a).

Posteriormente, Adzhar et al. (1996) retestou os oligonucleotídeos utilizados nos estudos realizados por Zwaagstra et al. (1992) e Andreasen et al. (1991), onde afirmaram serem os primeiros universais ao detectar todas as amostras testadas (41 isolados da América do Norte, Austrália, Europa e Japão - isoladas em um período total de 50 anos), mas não alcançando o mesmo resultado com os desenvolvidos para M-N (Andreasen et al., 1991), sendo estes úteis somente para diagnóstico de amostras isoladas na América do Norte. Jackwood et al. (1992) e Kwon et al. (1993 b) também não conseguiram amplificar todas as amostras com os oligonucleotídeos desenvolvidos para M - N, concordando com Wang & Tsai (1996), os quais não conseguiram detectar nenhuma amostra isolada em Taiwan com estes oligos. Os mesmos autores demonstraram, também, ser os oligonucleotídeos que reconhecem N (Zwaagstra et al., 1992) mais eficientes na detecção de amostras de VBIg do que aqueles para S1 (Kwon et al., 1993 a) e S2 (Lin et al.,

1991), já que somente uma entre oito e seis entre 14 isolados do VBIg de Taiwan foram detectados, respectivamente.

3.6. CONTROLE

O controle da BIG é feito, basicamente, por medidas de biossegurança (isolamento, lotes próximos com idade única, "all-in-all-out", desinfecção, vazios sanitários, dentre outras), incluindo programas de vacinação desenvolvidos de acordo com cada região. As vacinas utilizadas são vivas atenuadas, por passagens seriadas em OEG/SPF, e inativadas emulsionadas em óleo. As primeiras são aplicadas em frangos de corte e em primovacinação em lotes de matrizes e poedeiras comerciais e as segundas nas aves próximas da maturidade sexual (Gelb, 1988; Lamas da Silva, 1988; Branco, 1991; Yochida, 1991; Coutinho, 1991; Cavanagh & Naqi, 1997). No Brasil, somente o sorotipo Massachusetts, amostras H-120, H-90, H-52 (atenuadas por passagens em OEG/SPF) e MA-5 (atenuada e clonada) foi autorizado pelo Ministério da Agricultura para uso comercial (Di Fábio, 1993).

A vacinação contra o VBIg com amostra homóloga àquela responsável pelo desafio, reduz a transmissão do vírus por contato direto, a severidade das lesões macro e microscópicas, sinais clínicos e perdas na produção, mas não impedem a instalação de quadro subclínico (Sander et al., 1997; Wit et al., 1998).

O principal problema no controle da BIG é a presença de diversos sorotipos e variantes, não existindo proteção cruzada entre muitas destas e diminuindo à medida que a similaridade da proteína S1 também reduz entre as amostras (Gelb, 1988; Cavanagh et al., 1997).

Várias amostras do VBIg já foram e continuam sendo isoladas e caracterizadas como VBIg por todo o mundo (Karaca et al., 1990; Gelb et al., 1991; Lin et al., 1991; Gough et al., 1992; Kwon et al., 1993 a; Jia et al., 1995; Ignjatovic et al., 1997; Song et al., 1998; Erbeck & McMurray, 1998), inclusive no Brasil (Resende, 1983; Paniago, 1994; Martins et al., 1996; Epiphanyo, 1998; Souza, 1999).

Nos estados de Santa Catarina, Paraná e São Paulo, somente três amostras de 14 isolados de campo apresentaram relação antigênica com a amostra Beaudette (sorotipo Massachusetts) e nenhuma com a Arkansas (sorotipo Arkansas), após isolamento em OEG/ SPF e teste de SN em microplacas com células renais de pinto (Wentz, 1988).

O mesmo comportamento foi encontrado nas amostras isoladas de lotes de poedeiras no Estado de São Paulo, entre 1987 e 1991 (Di Fábio, 1993) e nas amostras isoladas de lotes de frango de corte no estado de Minas Gerais, entre 1972 a 1989, em relação ao sorotipo Massachusetts; sendo neste caso encontradas três amostras completamente e nove parcialmente diferentes de M41 por ELISA indireto utilizando MABs específicos para S1 (Martins et al., 1996).

Tais achados foram reforçados pela detecção, por RT-PCR e RFLP específicos para o gene S1 (Jackwood et al., 1997), de sete isolados na Região Sul completamente distintos das amostras Holland (H-120, H-90, H-52), Delaware 072, Flórida, Gray, Conn, Ark-DPI e M41 (Lunge et al., 1998; Ikuta, 1999).

Associados a esse obstáculo, encontram-se, também, a falta de consenso entre os profissionais da área quanto aos programas de vacinação, as más condições sanitárias de algumas criações (presença de *Escherichia coli*, *Mycoplasma* spp., adenovírus, vírus da doença de Gumboro, etc), que agravam os quadros de reações pós-vacinais e, também, interferem negativamente sobre a indução da resposta imune; falhas de vacinação, principalmente quanto à uniformidade desta e a difícil determinação do melhor grau de atenuação que associe da melhor maneira os parâmetros de segurança e antigenicidade (Lamas da Silva, 1989; Hopkins & Yoder, 1986; Saif, 1993; Di Fábio, 1993).

Assim, diversos surtos da doença continuam a ocorrer, mesmo em lotes vacinados, não obstante ser o sorotipo Massachusetts o que proporciona maior espectro antigênico em comparação a outros sorotipos (Lamas da Silva, 1989; Romero et al., 1989; Di Fábio, 1993; Villegas, 1997; Wu et al., 1998). Alternativamente, diversos países vêm usando

vacinas vivas atenuadas e, ou inativadas de amostras heterólogas ao sorotipo Massachusetts e de variantes, com bons resultados. Porém, a decisão de utilizar vacinas preparadas com amostras variantes deve estar sempre respaldada em diagnóstico seguro do novo vírus, o que atualmente não tem ocorrido devido aos métodos ainda empregados (Villegas, 1997).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O projeto foi idealizado e executado no setor de Doenças das Aves do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP) da Escola de Veterinária (EV) da UFMG.

4.1. AMOSTRAS DE VÍRUS

Foram utilizadas nove amostras de referência do VBIG (sete americanas e duas européias), denominadas controles positivos, e 15 brasileiras isoladas de surtos da doença clínica em plantéis não vacinados, na avicultura industrial do estado de Minas Gerais. As amostras de referência da ATCC (American Type Culture Collection/ EUA) foram importadas vivas com autorização do Ministério da Agricultura. A UK 6/82 foi gentilmente cedida pela Dra. Jane Cook do acervo do Institute for Animal Health (Reino Unido) em 1990 e, juntamente com as da SPAFAS/ EUA, foram recebidas previamente inativadas pelo calor (56°C/ 30 min.). O isolamento e a caracterização de 14 amostras brasileiras foram realizados pelos Profs. José Sérgio de Resende, Nelson Rodrigo da Silva Martins e Regino Leonardo de Oliveira no Laboratório de Doenças das Aves do DMVP da EV – UFMG e a amostra 208-10-BIG foi gentilmente cedida pelo Prof. Maurício Resende do Laboratório de Virologia Comparada do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) – UFMG.

Os órgãos de eleição utilizados nos isolamentos do VBIG foram: traquéia, pulmões e sacos aéreos de aves provenientes de surtos da BIG caracterizados por sintomatologia respiratória e/ ou reprodutiva e, somente os rins de aves com diarreia, mortalidade elevada e sintomatologia respiratória e de aves apresentando lesão renal macroscopicamente visível. A técnica utilizada para isolamento do VBIG foi a descrita por Lukert (1975): resumidamente, os órgãos foram macerados em gral com pistilo e areia estéreis,

hidratados com PBS ("Phosphate buffer saline" - tampão salina fosfato) (pH 7,4) autoclavado e centrifugados (5.000 xg/ 10 min./ 4°C). O sobrenadante foi coletado e tratado com antibióticos (Penicilina G potássica, estreptomicina e sulfato de gentamicina) e inoculado, via cavidade alantóidea, em OEG/SPF com 9 a 11 dias de incubação. No mínimo duas passagens consecutivas foram necessárias para o isolamento das amostras.

A indicação de que a amostra isolada provavelmente é VBI, tanto no isolamento inicial como na passagem realizada no vigente estudo, obedeceu aos seguintes critérios: 1) presença de nanismo, enrolamento, formação de

uratos nos mesonefros e hepatite hemorrágica em OEG/SPF inoculados com 9-10 dias de incubação e abertos 8-9 dias depois; 2) ausência de atividade hemaglutinante nos líquidos alantóideos (LA's) coletados dos OEG/SPF (72-96 horas após a inoculação) frente a hemácias de galinhas SPF; 3) ausência de neutralização com soros imunes de referência (SPAFAS/EUA) anti-vírus da doença de Newcastle e anti - adenovírus sorotipo 1.

Detalhes sobre as amostras de referência e brasileiras são apresentadas nas Tabelas 1 e 2, respectivamente.

Tabela 1- Amostras de referência de VBI usadas como controles positivos.

Amostras	Sorotipo (a)	Nº passagens em OEG/SPF (b)	Procedência (Laboratório/ País)
M41	Massachusetts	8	ATCC (c)/EUA
A5968	Connecticut	10	ATCC/EUA
JMK	JMK/ Gray	15	SPAFAS (d)/EUA
SE-17	SE-17	16	SPAFAS/EUA
Ark-99	Ark-99	7	ATCC/EUA
Iowa 609	I-609	10	SPAFAS/ EUA
Iowa 97	I-97	9	SPAFAS/ EUA
H-52	Massachusetts	52	SPAFAS/EUA
UK 6/82 (e)	UK 6/ 82	5	Institute for Animal Health (IAH)/ Houghton/ Reino Unido.

(a) Denominação de acordo com KWON et al., 1993 a.

(b) O nº de passagens (ovos embrionados de galinha SPF com 9-10 de incubação a 37°C - OEG/ SPF) corresponde à somatória das feitas no laboratório de origem, acrescidas das realizadas no Setor de Doenças das Aves -DMVP da EV-UFGM, inclusive da necessária para este estudo.

(c) American Type Culture Collection (ATCC), 112301 - Parklawn Drive, Rockville, MD-USA 20852.

(d) Importada inativada pelo calor (56°C/ 30 min.). SPAFAS, Norwich, CT-USA 06360 - 1301.

(e) Importada inativada pelo calor (56°C/ 30 min.). Variante utilizada como vacina inativada na Inglaterra.

Tabela 2 – Amostras de VBIG isoladas de surtos clínicos da BIG na avicultura industrial no Estado de Minas Gerais entre 1972 e 1989.

Amostra*	Número de passagens em OEG/SPF (a)	Ano de isolamento	Tipo de criação (b)	Sintomas principais no surto de origem (c)
208-10-BIG	6	1972	P	R/ QP/ POA
TII	6	1975	FC	R
G	8	1975	FC	R
29-78	6	1978	FC	R
200	4	1981	FC	R
283	3	1983	FC	R + SNN
290	3	1983	FC	R
297	3	1983	FC	R
319	3	1983	FC	R + SNN
327	3	1983	FC	R + SNN
351	4	1984	FC	R + SNN
PM1	4	1987	FC	R
PM2	3	1987	FC	R
PM3	3	1989	FC	R
PM4	3	1989	FC	R

* Caracterizadas como VBIG segundo Resende et al. (1998).

(a) Incluindo a passagem necessária para este estudo.

(b) P: Poedeira; FC: Frango de corte.

(c) R: Respiratório; QP: Queda de postura; POA: Postura de ovos anormais; SNN: Síndrome nefrite - nefrose.

Como controle negativo de especificidade, foi utilizada a amostra La Sota do vírus da doença de Newcastle (VDN) (Família: *Paramyxoviridae*, Subfamília: *Paramyxovirinae*, Gênero: *Rubulavírus*) por ser este um vírus RNA, que também infecta galinhas e provoca quadros clínicos com sinais parecidos com os da BIG. Como controle negativo de sistema, um "pool" de LA's de OEG/SPF não inoculados foram colhidos e processados igualmente.

As amostras vivas utilizadas neste estudo estão estocadas em botijão de nitrogênio líquido (-196°C), para evitar a necessidade de passagens seriadas em OEG/SPF, o que levaria a alterações irreversíveis em sua antigenicidade e patogenicidade (Cavanagh & Naqi, 1997). As adquiridas inativadas, foram concentradas, conforme descrito no item 4.2, e estão alíquotadas e criopreservadas.

4.2. REPLICAÇÃO E CONCENTRAÇÃO VIRAL

O processo de replicação viral foi baseado nos estudos realizados por Zwaagstra et al. (1992), Adzhar et al. (1996) e Wang & Tsai (1996), com modificações, principalmente no tocante à concentração do vírus. Somente foram replicadas as amostras de referência adquiridas

vivas M41, A5968 e Ark-99 (ATCC, EUA) e as 15 brasileiras.

As inoculações dos OEG/SPF foram realizadas dentro de cabine de fluxo laminar vertical (Mod. FLV-Classe II, Trox, Brasil), previamente desinfetada, usando 15 ovos férteis com 10 dias de incubação (incubadora Petersime Labo 13) por amostra (incluindo os controles negativos, sem VBIG ou com VDN). Cada vírus estoque foi previamente diluído 1:1000 [para conter aproximadamente 1000 DIE₅₀ (Dose capaz de infectar 50% dos embriões dos OEG/SPF)/0,1 mL] em PBS (pH 7,4) autoclavado e, posteriormente, adicionado com 40 UI/ mL de penicilina G potássica, 4 mg/ mL de estreptomicina e 80 µg/ mL de sulfato de gentamicina (após adição dos antibióticos, filtragem em filtro descartável seringa 0,22 µ - Swinnex Millipore, EUA), sendo 0,1 mL/ ovo inoculado na cavidade alantóideia. Os OEG/SPF inoculados foram incubados (Incubadora automática Petersime/ Rooster, mod. Labo 13/9, Brasil) por um período de 48 a 72 horas a 37°C e 80% de umidade. Diariamente foi realizada ovoscopia e descarte (balde com formol a 10%) dos OEG/ SPF com embriões mortos até 24 horas após inoculação (morte inespecífica como erro de inoculação, provavelmente). Após 48-72

horas de incubação, dois OEGs por amostra, incluindo dois controles negativos, foram mantidos na incubadora até 216 horas após a inoculação, para avaliação da presença (ou não) de lesões características do VBIG (nanismo e enrolamento do embrião), sendo os demais embriões vivos resfriados a 4°C por 16 horas. Para cada amostra de VBIG, foi obtido um "pool" de LA's em frasco estéril, coletados dentro de cabine de fluxo laminar, sob refrigeração e desinfecção prévia da casca do ovo com álcool iodado 3%. Do "pool" resultante, foi retirado uma alíquota da amostra para verificar atividade hemaglutinante frente a uma suspensão (5%) de hemácias de galinhas SPF. O restante do "pool" de LA's permaneceu em repouso (24h./ 4°C) para decantação natural de hemácias e resíduos celulares. A concentração da amostra viral foi feita em membranas de diálise [Spectrapor™, ϕ do poro 12.000 MW (Molecular weight - Peso molecular), 45 mm de ϕ , Spectrum Medical Industries, EUA], previamente lavada (externa e internamente) com detergente (Extran, Merck), enxaguada diversas vezes e fervida durante 10 minutos, imersa em água destilada. As membranas de diálise contendo "pool" de LA's rico em VBIG, inclusive dos controles negativos, foram imersas dentro de um recipiente contendo solução concentrada (50%) de polivinilpirrolidone [PVP, 360, Sigma, EUA, preparada com água 18 M Ω (Megaohm) - livre de RNase] previamente autoclavada e resfriada, sendo posteriormente mantidas em geladeira (4°C) por 24 a 48 horas ou até completa desidratação do material.

O material desidratado retido nas membranas de diálise foi ressuscitado (1:100) em PBS (pH 7,4) autoclavado, colocado em um criotubo (\pm 2 mL) e mantido em nitrogênio líquido até o momento do uso para extração do RNA total.

4.3. EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL (INCLUINDO O VIRAL)

A extração do RNA total incluindo o viral (RNAtiv) foi baseada no manual da BRL (1998) e no estudo de Adzhar et al. (1996).

Uma alíquota (criotubo/ 2 mL) de cada amostra (controles positivos ou de referência, brasileiras e controles negativos) foi retirada do nitrogênio líquido e descongelada em água corrente, sendo

rapidamente imersa em banho de gelo e depois centrifugada (6500 xg/ 3 min/ 4°C) (Microcentrifuga, mod. 212 centimicro, rotor ângulo fixo, FANEM, Brasil). Do sobrenadante, retirou-se 500 μ L e foram colocados 250 μ L em dois microtubos (1500 μ L, livre de RNase, estéril, Eppendorf, Alemanha), adicionando-se em cada um destes 15 μ L de Ribonucleoside Vanadyl Complexes (Sigma, EUA) como inibidor de endonucleases. Os microtubos foram, então, rapidamente vortexados e centrifugados, sendo a extração de RNA conduzida através dos seguintes passos: adição de 750 μ L de Trizol LS (BRL, EUA) por microtubo, com completa homogeneização (por lenta pipetagem) e repouso (5 min./ TA = temperatura ambiente). Logo após, colocou-se 250 μ L de clorofórmio p.a, com agitação manual vigorosa dos microtubos (15 seg.) seguida de repouso (10 min./ TA) e centrifugação (13.000 xg/ 15 min./ 4°C) para separação das fases. Nesse procedimento, o RNAtiv fica solubilizado na fase aquosa superficial (branca) e o DNA e proteínas na fase orgânica (vermelha), sendo, portanto, o sobrenadante removido (900 μ L) para um novo microtubo (1500 μ L). Cada microtubo recebeu 500 μ L de isopropanol (livre de RNase, Sigma, EUA), foi homogeneizado delicadamente (inversão manual/ 10 vezes) e mantido em repouso (10 min./ TA). O RNAtiv foi precipitado por centrifugação (13.000 xg/ 10 min./ 4°C) e o sobrenadante descartado. Rapidamente, foram adicionados 1000 μ L de solução de etanol 75% (livre de RNase, Sigma, EUA, preparada com água 18 M Ω livre de RNase, assim obtida pelo prévio tratamento com 0,1% dietilpirocarbonato -DEPC, Sigma, EUA, e autoclavação posterior), vortexada (5 seg.) e centrifugada (6500 xg/ 5 min./ 4°C). O etanol foi descartado por derramamento e os tubos deixados inclinados abertos sobre a bancada à TA, por até 10 min., tomando cuidado para o "pellet" de RNAtiv não secar.

Os "pellets" resultantes (dois microtubos/ amostra) foram, então, ressuscitados em 20 μ L de água 18 M Ω (livre de RNase), homogeneizando-os com a ponteira em movimentos circulares, aglutinados em um único microtubo novo (500 μ L - tipo PCR, Eppendorf, Alemanha), passando a chamar-se solução de RNA. Desta, 10 μ L foram

transferidos para outro microtubo novo (500 µL), para imediata reação de transcrição reversa (RT). O restante foi mantido em freezer comum (-20°C).

4.4. OLIGONUCLEOTÍDEOS (OLIGOS)

Os oligos utilizados neste estudo foram idealizados por Zwaagstra et al. (1992), sendo estes escolhidos pelo alinhamento de uma região com maior grau de conservação dentro do gene N das amostras KB8523, M41U, M41H e M42H. Esta região altamente conservada foi anteriormente obtida pelo alinhamento dos genes do nucleocapsídeo de todos os membros da família *Coronaviridae* presentes no EMBL e GenBank (24 e 60, respectivamente), estando localizada na porção amino terminal. O tamanho da seqüência obtida, incluindo os oligos BIGN1 e BIGN2, é de 438 pb., sendo cada oligo formado por 17 pb. (Tabela 3).

Tabela 3 - Oligonucleotídeos, seqüências de bases e localização no gene que codifica para a proteína N do VBIG.

Oligos (a)	Seqüências de bases	Localização (b)
BIGN2 (+)	5'-GTCTTGTCCCG CGTGTA-3'	24-40
BIGN1 (-)	5'-ACCCTTACCAG CAACCC-3'	445-461

(a) (+) forward; (-) reverse.

(b) Os números correspondem àqueles de Boursnell et al. (1985 a).

O fragmento amplificado e flanqueado pelos oligos está apresentado na Figura 3 (GenBak, acesso M 28566, M 95169, M 27569).

Figura 3 - Seqüência do fragmento da amostra M41 obtida no GenBank e regiões reconhecidas pelos oligos BIGN1 e BIGN2 (negrito)

```
5' gtcttgt cccgcgtgta cctctctagt attccaagggaaaactgtg
aggacacat atataataat aatctttgt catggcaagc
gtaaggcaactggaaagac agatgccccca gctccagtca
tcaaactagg aggaccaaag ccacctaaag ttggtcttc
tggaaatgca tcttggttc aagcaataaa agccaataag taaatatac
ctccgccca gtttgaaggt agcgtgttc ctgataatga
aaatctaaag tcaagccagc agcatggata ctggagagc
caagctactg ttaagccagg caaagggtga agaaaaccag
tccagatgc ttggtattt tactatactg gaacaggacc tccgcctaac
ctgaattggg gtgatagcca agatgtata gtgtgggttg
ctgtaaggg t 3'
```

Este fragmento de M41 foi usado no programa BLASTN (Basic Local Alignment Search Tool), desenvolvido pela NCBI, para uma busca rápida de similaridade no banco de dados de ácidos nucléicos. Além deste fragmento, os de outras amostras virais do VBIG e os oligos também foram pesquisados no programa BLASTN. Os resultados obtidos nessa pesquisa realizada no programa BLASTN estão listados abaixo, sendo a primeira do fragmento de M41 apresentado na Figura 3, a segunda do oligo BIGN1 e a terceira do oligo BIGN2.

Alinhamentos do fragmento da amostra M41 obtida no GenBank pelo programa BLASTN:

Sequences producing significant alignments:	Score (bits)	Value	Identities
gb M28566.1 BAMPUP Avian infectious bronchitis virus (M41)...	868	0.0	100%
gb M28565.1 BABEAU Avian infectious bronchitis virus (Beau...	658	0.0	94%
gb U49858.1 AIU49858 Avian infectious bronchitis virus stra...	632	e-179	93%
emb X58002.1 CORNCPGA Infectious bronchitis virus (IBV) nuc...	587	e-165	95%
gb M85244.1 BBNUPRA Infectious bronchitis virus nucleocaps...	500	e-139	92%
gb U04805.1 AIU04805 Avian infectious bronchitis virus nucl...	484	e-134	93%
gb S48137.1 S48137 nucleocapsid protein [infectious bronchi...	484	e-134	92%
gb M85245.1 BBNUPRB Infectious bronchitis virus nucleocaps...	484	e-134	93%
gb M85246.1 BBNUPRC Infectious bronchitis virus nucleocaps...	436	e-120	90%

>gb|M28565.1|BABEAU Avian infectious bronchitis virus (Beaudette) nucleocapsid protein (negrito: oligos, negrito + sublinhado: "gap" ou regiões do genoma viral que apresentaram-se diferentes entre as amostras M41 e Beaudette), Length = 1836
Score = 658 bits (332), Expect = 0.0
Identities = 410/436 (94%)
Strand = Plus / Plus

Query: 3 **ctgtgccgcgtgta**ctctdtagtattccaagggaactgtgagggacacataata 62
Sbjct: 26 **ctgtgccgcgtgta**ctctdtagtattccaagggaactgtgagggacacataata 85

Query: 63 ataataatcttttgcattggcaagcggtaaggcaactggaagacagatgccocagctcc 122
Sbjct: 86 ataataatcttttgcattggcaagcggtaaggcaactggaagacagatgccocagctcc 145

Query: 123 agtcatcaactaggaggacccaagccaactaaagtggtctctggaaatgcatctg 182
Sbjct: 146 agtcatcaactaggaggacccaagccaactaaagtggtctctggaaatgcatctg 205

Query: 183 gtttcaagcaataaaagccaataagttaaatatacctccgccaagttgaagtagcgg 242
Sbjct: 206 gtttcaagcaataaaagccaataagttaaatatacctccgccaagttgaagtagcgg 265

Query: 243 tgtctcgataatgaaaa**ctaaag**ccaagccagcagcagatgatactggagcggcaagc 302
Sbjct: 266 tgtctcgataatgaaaa**ctaaag**ccaagccagcagcagatgatactggagcggcaagc 325

Query: 303 **ta**cgfttaagccaaggcaaggtggaagaaaaccagccagatgcttgta**ttt**acta 362
Sbjct: 326 **ca**gfttaagccaaggcaaggtggaagaaaaccagccagatgcttgta**ttt**acta 385

Query: 363 **tact**ggaacaggaactcccgctgaactgaatggggatagccagatgata**gtgggtt**gctgtaagggt 438
Sbjct: 386 **tact**ggaacaggaactcccgctgaactgaatggggatagccagatgata**gtgggtt**gctgtaagggt 461

>gb|S48137.1|S48137 nucleocapsid protein [infectious bronchitis virus IBV, Gray, Genomic RNA, 1230 nt] (Negrito + sublinhado: "gap" ou regiões do genoma viral que apresentaram-se diferentes entre as amostras M41 e Gray), Length = 1230
Score = 484 bits (244), Expect = e-134
Identities = 325/352 (92%)
Strand = Plus / Plus

Query: 79 atggcaagcggtaaggcaactggaagacagatgccocagctccagtcataactagga 138
Sbjct: 1 atggcaagcggtaaggcaactggaagacagatgccocagctccagtcataactagga 60

Query: 139 ggaccaagccaactaaagtggtctctggaaatgcatctggttcaagcaataaaa 198
Sbjct: 61 ggaccaagccaactaaagtggtctctggaaatgcatctggttcaagcaataaaa 120

Query: 199 gccaataagtttaata**ta**ctccgccaagttgaagtagcgggtgtctgataatgaa 258
Sbjct: 121 gccaataagtttaata**ta**ctccgccaagttgaagtagcgggtgtctgataatgaa 180

Query: 259 **aat**ctaaagtcagccagcagcagatgatactggagcggcaagct**ac**gfttaagccagcc 318
Sbjct: 181 **aat**ctaaagtcagccagcagcagatgatactggagcggcaagct**ac**gfttaagccagcc 240

Query: 319 aaaggtggaagaaaaccagccagatgcttgta**ttt**actatactggaacaggacct 378
Sbjct: 241 aaaggtggaagaaaaccagccagatgcttgta**ttt**actatactggaacaggacct 300

Query: 379 gccgctgaactgaattggggatagccaagatggtatag**gtgggt**gctg 430
Sbjct: 301 gccgctgaactgaattggggatagccaagatggtatag**gtgggt**gctg 352

>gb|M85245.1|IBBNUPRB Infectious bronchitis virus nucleocapsid protein gene, complete cds (Negrito + sublinhado: "gap" ou regiões do genoma viral que apresentaram-se diferentes entre as amostras M41 e esta apresentada no Gen Bank), Length = 1230
Score = 484 bits (244), Expect = e-134
Identities = 325/352 (92%)
Strand = Plus / Plus

Query: 79 atggcaagcggtaaggcaactggaagacagatgccocagctccagtcataactagga 138
Sbjct: 1 atggcaagcggtaaggcaactggaagacagatgccocagctccagtcataactagga 60

Query: 139 ggaccaagccaactaaagtggtctctggaaatgcatctggttcaagcaataaaa 198
Sbjct: 61 ggaccaagccaactaaagtggtctctggaaatgcatctggttcaagcaataaaa 120

Query: 199 gccaataagtttaata**ta**ctccgccaagttgaagtagcgggtgtctgataatgaa 258
Sbjct: 121 gccaataagtttaata**ta**ctccgccaagttgaagtagcgggtgtctgataatgaa 180

Query: 259 **aat**ctaaagtcagccagcagcagatgatactggagcggcaagct**ac**gfttaagccagcc 318
Sbjct: 181 **aat**ctaaagtcagccagcagcagatgatactggagcggcaagct**ac**gfttaagccagcc 240

Query: 319 aaaggtggaagaaaaccagccagatgcttgta**ttt**actatactggaacaggacct 378
Sbjct: 241 aaaggtggaagaaaaccagccagatgcttgta**ttt**actatactggaacaggacct 300

Query: 379 gccgctaacctgaattggggtgatagccaagatggtatagtggtgctg 430
 Sbjct: 301 gccgctgactgaattggggtgatagccaagatggtatagtggtgctg 352

>gb|U52594.1|AIU52594 Avian infectious bronchitis virus Vic S nucleocapsid protein mRNA, complete cds (Negrito + sublinhado: "gap" ou regiões do genoma viral que apresentaram-se diferentes entre as amostras M41 e Vic S), Length = 1676
 Score = 333 bits (168), Expect = 3e-89
 Identities = 306/352 (86%)
 Strand = Plus / Plus

Query: 79 atggcaagcggtaaggcaactggaaagcagatgccccagctccagtcatcaactagga 138
 Sbjct: 1 atggcaagcggtaaggcaactggaaagcagatgccccagctccagtcatcaactagga 60

Query: 139 ggacaaagccaccctaaagtggctctctggaaatgcatctggttcaagcaataaaa 198
 Sbjct: 61 ggacaaagccaccctaaagtggctctctggaaatgcatctggttcaagcaataaaa 120

Query: 199 gccaaatagtaaatataoctccgccaagttgaaggtagcgggtgtcctgataatgaa 258
 Sbjct: 121 gctaaagaactgaatgtaoctcaaccagttgaaggtagcgggtgtcctgataatgaa 180

Query: 259 aatctaaagcaagcagcagcatggatactggagacgccaagctacgttaagccaggg 318
 Sbjct: 181 aatctaaagcaagcagcagcatggatactggagacgccaagctacgttaagccaggg 240

Query: 319 aaagctggagaaagccagctccagatgctggtattttatactggaacaggacct 378
 Sbjct: 241 aaagctggagaaagccagctccagatgctggtattttatactggaacaggacct 300

Query: 379 gccgctaacctgaattggggtgatagccaagatggtatagtggtgctg 430
 Sbjct: 301 gccgctgactgaattggggtgaaagccaagcagatagtggtgctg 352

Alinhamentos do oligo BIGN1 pelo programa BLASTN:

Sequences producing significant alignments:	Score (bits)	Value	Identities
gb M28566.1 IBAMPUP Avian infectious bronchitis virus (M41)...	34	0.085	100%
gb AC002115.1 HSAC002115 Human DNA from overlapping chromos...	30	1.3	100%
emb X99132.1 PCR1REP Plasmid pCR1 of C.renale containing ge...	30	1.3	100%
gb AC003088.1 AC003088 Human BAC clone CTB-119P24 from 7q31...	28	5.2	100%
gb AC007268.4 AC007268 Arabidopsis thaliana chromosome II s...	28	5.2	100%
gb AC007018.6 AC007018 Arabidopsis thaliana chromosome II s...	28	5.2	100%
gb AC002388.2 AC002388 Arabidopsis thaliana chromosome II s...	28	5.2	100%
gb AC004850.2 AC004850 Homo sapiens PAC clone RP4-665C4 fro...	28	5.2	100%
gb AC005384.2 AC005384 b326h7, complete sequence [Homo sapi...	28	5.2	100%
gb AF180143.1 AF180143 Glycine max ubiquitin carrier protei...	28	5.2	100%

>gb|M28566.1|IBAMPUP Avian infectious bronchitis virus (M41) nucleocapsid protein

Query: 1 ggggtgctggttaagggt 17
 Sbjct: 445 ggggtgctggttaagggt 461

Alinhamentos do oligo BIGN2 pelo programa BLASTN:

Sequences producing significant alignments:	Score (bits)	Value	Identities
gb M28566.1 IBAMPUP Avian infectious bronchitis virus (M41)...	34	0.085	100%
gb AF072911.1 AF072911 Turkey coronavirus strain Minnesota ...	30	1.3	100%
gb U46037.1 AIU46037 Avian infectious bronchitis virus CU-T...	30	1.3	100%
gb U49858.1 AIU49858 Avian infectious bronchitis virus stra...	30	1.3	100%
gb M95169.1 IBACGB Avian infectious bronchitis virus pol pr...	30	1.3	100%
gb M21515.1 IBASPMNCF Avian infectious bronchitis virus spi...	30	1.3	100%
gb M25905.1 IBAMNCA Avian infectious bronchitis virus matri...	30	1.3	100%
gb M28565.1 IBABEAU Avian infectious bronchitis virus (Beau...	30	1.3	100%

gb AF136399.1 AF136399 Mus musculus thioredoxin reductase (...)	28	5.2	100%
gb AF171053.1 AF171053 Mus musculus thioredoxin reductase T...	28	5.2	100%

>gb|M28566.1|IBAMPUP Avian infectious bronchitis virus (M41) nucleocapsid protein

Query: 1 gcttgcctccgcgtgta 17
Sbjct: 24 gcttgcctccgcgtgta 40

>gb|U49858.1|AIU49858 Avian infectious bronchitis virus strain CU-T2 spike protein (gene 2), gene 3, membrane protein (gene 4), gene 5, nucleocapsid protein (gene 6) genes, complete cds

Query: 3 ctgtcccgcgtgta 17
Sbjct: 5594 ctgtcccgcgtgta 5608

>gb|M95169.1|IBACGB Avian infectious bronchitis virus pol protein, spike protein, small virion-associated protein, membrane protein, and nucleocapsid protein genes, complete cds

Query: 3 ctgtcccgcgtgta 17
Sbjct: 25797 ctgtcccgcgtgta 25811

Pesquisas manuais e por computador (programa Word 97) foram realizadas do genoma inteiro do VBIG (amostras M41, Beaudette, Gray, Ark-99 e CU-T2), na tentativa de localizar alguma (s) região (ões) que apresentasse(m) complementariedade total ou parcial com os oligos BIGN1 e BIGN2, não sendo detectada nenhuma região flanqueada pelos dois oligos além da utilizada no estudo, somente o pareamento de uma pequena parte destes, geralmente 3 a 4 bases da porção inicial do oligo (extremidade 5') e em regiões muito distantes um do outro, quase sempre em genes diferentes.

A diluição dos oligos, adquiridos por encomenda (BRL, EUA), denominados BIGN1 e BIGN2, foi realizada em cabine de fluxo laminar (Classe II, FLV, TROX, Brasil), com solução tampão TE [10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA (pH 8,0)] autoclavada, de forma a se obter uma solução estoque com aproximadamente 100 µM (100 pmol/ µL), conforme recomendação do fabricante (BRL, EUA). A quantidade de TE utilizada foi baseada nos parâmetros fornecidos pelo fabricante (µg/OD, OD's e peso molecular dos oligos). Estes oligos diluídos em TE foram vortexados e centrifugados rapidamente (5 seg./ 6500 xg, respectivamente), sendo mantido 24 horas em geladeira (4°C) para total dissolução do produto. Após este período, as soluções estoque dos oligos foram novamente diluídas com água 18 MΩ livre de RNase, de modo a obter-se soluções de uso com 10 µM, conforme

recomendação do fabricante (BRL,EUA). Essa mistura foi alíquotada em volumes que permitissem uma única utilização desta por reação de RT-PCR e descarte do restante. Foram utilizados criotubos (2000 µL) novos e estéreis, com tampa rosqueável e anel vedador de borracha, para evitar a desidratação das soluções (estoque e uso) durante estocagem no freezer (-20°C) e, conseqüentemente, alteração das concentrações.

4.5. SÍNTESE DE cDNA (DNA COMPLEMENTAR) - TRANSCRIÇÃO REVERSA (RT)

A transcrição reversa (RT) foi realizada como descrito por ADZHAR et al. (1996) e seguindo o protocolo do fabricante (BRL, 1998), sendo utilizado o oligo complementar BIGN1. Esse oligo, na quantidade de 2 µl e concentração final de 2 µM, foi adicionado ao microtubo contendo 10 µL da solução de RNAtiv, sendo essa solução incubada a 70°C por 10 min. para a desnaturação do RNA e, logo após, em banho de gelo (1 min.). Para cada amostra, foram adicionados 8 µl de uma solução contendo 2 µL de tampão PCR 10X [200 mM Tris-HCl (pH 8,4), 500 mM KCl], 2 µL MgCl₂ (25 mM), 1 µL dNTP (deoxirribonucleosídeo trifosfatado) mix (10 mM de cada dNTP) e 2 µL de DTT (Dithiothreitol) (0,1 M), todos componentes do kit (vide abaixo, neste item) e 1µL de RNasin (40 U/ µL, Promega, EUA), adicionando-se imediatamente 1 µL (200U) da enzima transcriptase reversa do vírus "Moloney" da

leucemia murina (kit SuperScript II RT RNase H⁺, BRL, EUA), num volume total de reação de 20 µL. A mistura foi então vortexada (5 seg.), centrifugada rapidamente (6.500 xg/ 10 seg.) e incubada a 42°C por 90 min. (PTC-100, MJ Research, EUA). A reação foi paralizada pela inativação da enzima a 70°C por 15 min., mantendo a mistura, posteriormente, sempre em banho de gelo. Adicionou-se, então, 1µL de RNase H⁺ (vem no kit Superscript II RT) para cada amostra no intuito de eliminar RNA residual, o qual, se presente na solução de cDNA, poderia interferir negativamente na amplificação (PCR). Esta mistura foi vortexada e centrifugada rapidamente, sendo, em seguida, incubada a 37°C por 20 min. Os cDNAs (VBIGs controles positivos e brasileiras e controles negativos - VDN e LA) foram estocados em freezer (-20°C) até a realização da PCR.

4.6. REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR)

Na PCR, foram testados vários parâmetros para obtenção de condições ótimas na detecção de parte do gene N do VBIG pela PCR, sendo estes: variação na concentração da MgCl₂ (1,5 mM a 3,0 mM); na temperatura de anelamento (46°C, 50°C, 55°C, 57°C, 58°C, 60°C, 62°C, 64°C, 66°C); no número de ciclos (26 a 44 ciclos); na temperatura e tempo das diversas fases, principalmente nos ciclos iniciais. Com as condições ótimas determinadas, a reação de PCR foi realizada em microtubo novo estéril (500 µL, livre de DNase,) utilizando 1 µL do cDNA; 5 µL de tampão PCR 10X [50 mM Tris - HCl (pH 8,0), 100 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 50% glicerol, 1% Triton[®] X-100] (Promega, EUA); 4 µL de MgCl₂ (25 mM) (Promega, EUA); 1 µL de dNTP (10 mM de cada dNTP) (Promega, EUA); 1 µL de cada oligonucleotídeo (10 µM/ cada) (BRL, EUA) e 0,5 µL de *Taq* DNA polimerase (5U/ µL) (Promega, EUA), completando-se para 50 µL com água 18 MΩ (livre de DNase). As concentrações inicial e final dos reagentes encontram-se na Tabela 4. A mistura foi coberta com 40 µL de óleo mineral especial (livre de DNase - Sigma, EUA). A reação foi conduzida num termociclador (PTC-100, MJ. Research, EUA) conforme o seguinte programa: um ciclo inicial a 94°C por 3 min., 58°C por 2 min., 72°C por 3 min. e 28 ciclos a 94°C por 1 min., 64°C

por 2 min. e 72°C por 3 min. A extensão final foi feita a 72°C por 10 min. seguida de um ciclo de 25°C por 2 min. para estabilização do equipamento. As amostras foram mantidas a -20°C até a eletroforese em gel de agarose 2% e análise em luz ultravioleta (UV) após coloração com brometo de etídio (EtBr).

Para comprovação da especificidade dos oligos BIGN1 e BIGN2, foram submetidos à PCR os cDNAs preparados a partir do VDN e, também, do "pool" de LA's.

Tabela 4 - Concentrações inicial e final dos reagentes utilizados na PCR após otimização.

Reagentes	Concentração inicial	Concentração final
Tampão PCR (a)	10X	1X
MgCl ₂ (a)	25 mM	2,0 mM
dNTPmix (a)	10 mM (c)	0,2 mM (c)
BIGN1 (b)	10 µM	200 nmol
BIGN2 (b)	10 µM	200 nmol

(a) Promega, EUA.

(b) BRL, EUA.

(c) Concentração de cada dNTP (A, T, G, C).

4.7. ANÁLISE DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS

A análise dos produtos amplificados foi realizada segundo o manual do fabricante (BRL, EUA) e Sambrook et al. (1989).

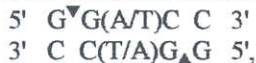
Após a PCR, coletou-se 12 µL do produto amplificado (amplicon), misturando-o a 8 µL de tampão TBE (Tris borato -EDTA) 0,5X (BRL, EUA) [100 mM Tris-base; 2,0 mM de solução 0,5M EDTA (pH 8,0) e 50 mM ácido bórico anidro] e 4 µL de tampão de corrida Blue/Orange 6X Loading Dye (Promega, EUA) [15% Ficoll 400; 0,03% azul de bromofenol; 0,03% de xileno cianol FF; 0,4% orange G; 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) e 50 mM EDTA]. A mistura foi analisada em eletroforese em gel de agarose 2,0% (p/v) (livre de DNase, Sigma, EUA), nas dimensões de 3 mm de espessura e 20x25 cm (largura x comprimento), em TBE 0,5X. A corrida foi efetuada à TA em 100 V com tempo médio de quatro horas e 30 min., num aparelho de eletroforese Horizon 20x25 (BRL, EUA) e, imediatamente, o gel foi corado com uma solução de EtBr na concentração de

0,5 µg/mL durante 30 min. no escuro. O DNA amplificado foi detectado utilizando-se um transluminador ultravioleta (302 nm - Macrovue™, Hoefer/ Pharmacia, EUA) e fotografado com câmara especial (GelCam, Polaroid, EUA), equipada com filme Polaroid 667 e filtro laranja nº 15 (Pharmacia, EUA). Como padrão de peso molecular, foi empregado o 100 bp DNA Ladder (5 µL / canaleta - Promega, EUA).

4.8. ANÁLISE DO POLIMORFISMO NOS FRAGMENTOS OBTIDOS COM O USO DE ENZIMAS DE RESTRIÇÃO (RFLP)

Para assegurar que o produto principal de amplificação estivesse correto, foi feita uma pesquisa das possíveis enzimas de restrição e dos produtos de tais digestões dos fragmentos do gene do nucleocapsídeo flanqueados pelos oligonucleotídeos BIGN1 e BIGN2 para as amostras encontradas no programa GenBank (M41, Beaudette, Gray, Ark-99, CU-T2, D1466, VicS, Q3/88, N1/62, N9/74, N1/88, N2/75). A análise do mapa de restrição foi obtida no programa WebGene, sendo a endonuclease de restrição escolhida a *AvaII*, por gerar, nas inúmeras amostras estudadas, um padrão de corte muito parecido entre si.

A enzima *AvaII*, originada de clonagem em *Escherichia coli* e apresentando como fonte a bactéria *Anabaena variabilis*, apresenta a seguinte seqüência de reconhecimento



e 100% de atividade no tampão 4-Core® Buffer System C (Promega, EUA).

A reação de digestão enzimática dos amplicons produzidos pela PCR foi conduzida conforme protocolo do fabricante (Promega, EUA). Uma mistura dos componentes (acompanham a enzima) foi preparada contendo 5 µL de tampão 4-Core® Buffer System C 10X [100 mM Tris-HCl (pH 7,9), 500 mM NaCl, 100 mM MgCl₂ e 10 mM DTT]; 0,5 µL de BSA acetilado (soro albumina bovina) (10 µg/ µL); 0,5 µL de *AvaII* (10U/µL - Promega EUA), adicionando água 18 MΩ livre de DNase, até o volume final de 20 µL para cada amplicon a ser estudado. As concentrações inicial e final dos reagentes encontram-se na Tabela 5.

Tabela 5 - Concentrações inicial e final dos reagentes utilizados na reação de digestão pela enzima *AvaII*

Reagentes (a)	Concentração inicial	Concentração final
Tampão 4-Core® Buffer System C	10X	1X
BSA	10µg/ µL	0,1 µg/ µL

(a) Promega, EUA.

Após ter homogeneizado delicadamente essa mistura, adicionou-se 30 µL de cada amplicon no microtubo correspondente, promovendo nova homogeneização delicada. Esta solução foi incubada a 37°C por 4 horas, tampa quente, no termociclador (PTC - 100) e dividida em dois microtubos (500 µl -PCR) que permaneceram no freezer (-20°C) até análise dos produtos da digestão enzimática.

4.9. ANÁLISE DOS PRODUTOS DE DIGESTÃO ENZIMÁTICA (RFLP)

Esta etapa apresentou os mesmos passos e reagentes empregados no item 4.7 de "Análise de produtos amplificados", exceto por ter feito a mistura para aplicação em gel de agarose 2,0% composta de 20 µL de produto de digestão enzimática e 4 µL de Blue/ Orange 6X Loading Dye (Promega, EUA). Além disso, a corrida foi efetuada num período de duas horas (100 V), à TA, para um gel de mesmo tamanho, espessura e concentração.

4.10. BIOSSEGURANÇA LABORATORIAL

Devido ao alto risco de contaminação do ambiente laboratorial por amplicons (praticamente indestrutíveis) (Newton, 1997), os laboratórios, equipamentos e reagentes para produção de cDNA e PCR/eletroforese são completamente separados. Além disso, o fluxo de trabalho sempre respeitou o sentido de primeiramente realizar todas as tarefas referentes à sala de extração de RNA e RT para depois trabalhar na de PCR/ eletroforese, não retornando, portanto, à primeira. Todos os procedimentos foram realizados dentro de cabine de fluxo laminar reservada para uso exclusivo em biologia molecular, com luvas novas (sem pó), material descartável novo e

estéril (livre de RNase/DNase), não sendo, posteriormente, reutilizado em testes de biologia molecular. Tanto para manipulação de RNA e cDNA quanto para amplicons, foram utilizadas ponteiras novas, estéreis e com barreira de aerossol (livre de RNase/DNase), além de um conjunto de micropipetas de boa qualidade para cada caso. As soluções de TE, oligos e água 18 MΩ livre de RNase/DNase foram aliquotadas em microtubos novos (1500 µl, estéril, livre de RNase/DNase, Eppendorf, Alemanha), para evitar contaminações das soluções estoques e, após o uso, o resto das soluções descongeladas sempre foram descartadas.

Obrigatoriamente, os aventais usados eram trocados diariamente. Semanalmente, os laboratórios eram limpos e desinfetados com amônia quaternária, hipoclorito e álcool 70%.

Todo o material oriundo de OEG/SPF, infectado ou não, foi descartado em baldes plásticos descartáveis com tampa de pressão (contendo solução aquosa de formol comercial 10%) aí permanecendo durante 72 horas (TA) e, depois, sendo enviado para forno crematório.

Após o uso, as soluções contendo Trizol e EtBr (caústico e mutagênico, respectivamente) foram armazenadas em garrafas plásticas para futura destinação adequada.

Toda vidraria, material plástico, de acrílico e outros reutilizáveis tiveram lavagem especial específica para uso em biologia molecular, sendo sempre lavados inicialmente com uma solução de 1-5% de detergente Extran MA 02 Neutro (Merck, Alemanha) preparada com água destilada e deionizada (dd), enxaguados diversas vezes com água dd e tratados com solução, não diluída, de RNase Away (BRL) *overnight* (mantidos úmidos dentro de sacos plásticos). Após enxágüe exaustivo em água dd (10 vezes) e 18 MΩ (enxágüe final), as vidrarias tiveram o seguinte tratamento: 100 a 150°C/ 30 min. (forno de secagem e esterilização, FANEM, Brasil), resfriamento natural, embalagem em papel alumínio e esterilização a seco por calor (150-200°C/ 5 horas) visando acabar com RNase/ DNase. No caso do material plástico, de acrílico e outros, a secagem foi feita em estufa bacteriológica (37-56°C) *overnight*. Após secagem e resfriamento natural, todos os materiais foram vedados com papel filme de

nitrocelulose e guardados em local adequado (protegidos da poeira).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. REPLICAÇÃO E CONCENTRAÇÃO VIRAL

O método de inoculação em OEG/SPF, para replicação do vírus, foi efetivo quanto à facilidade e alta produção de LA (100-150 mL/ VBIG ou VDN). As amostras JMK, Iowa 97 e Iowa 609, por causarem rápida e alta mortalidade embrionária, gerando LA's hemorrágicos, foram novamente inoculadas nas diluições 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} , sendo todas posteriormente confirmadas como VBIG pela RT-PCR. A presença de lesões características do VBIG foi observada nos embriões deixados como controles positivos de OEG/SPF com todas as amostras, exceto nos controles negativos. Em nenhuma delas foi detectada atividade hemaglutinante frente a hemácias de galinhas SPF, sendo esta observada e confirmada apenas para a amostra La Sota do VDN. Tal procedimento mostrou-se eficaz para a finalidade, concordando com estudos anteriormente publicados (Andreasen et al., 1991; Jackwood et al., 1992; Zwaagstra et al., 1992; Kwon et al., 1993 a, b; Adzhar et al., 1996; 1997; Falcone et al., 1997; Song et al., 1998).

A concentração do vírus por desidratação, induzida pelo PVP, apresentou bons resultados, aliados à simplicidade de permitir a realização deste em inúmeras amostras ao mesmo tempo, rapidez e menor custo quando comparada aos métodos anteriormente citados de alta centrifugação a 436.000 xg/ 1 hora (Zwaagstra et al., 1992) e purificação em colchão ou gradiente de sacarose, com várias etapas de centrifugação (Sutou et al., 1988; Andreasen et al., 1991; Lin et al., 1991; Jia et al., 1995), sem afetar o resultado deste experimento. Sendo assim, é factível a sua utilização em procedimentos de rotina laboratorial (triagem) que visem confirmar isolados, suspeitos de serem VBIG, por detecção da parte do gene N estudada, o que, também, foi conseguido por Resende et al. (1998) para uma parte conservada do gene S2.

5.2. EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL (INCLUINDO O VIRAL)

O RNAtiv obtido pelo método apresentado neste estudo permaneceu íntegro, a julgar pelos resultados finais, sendo este total e não altamente purificado como utilizado por Stern & Kennedy (1980), e, posteriormente, por Andreasen et al. (1991), o qual, pela maior manipulação, gera riscos quanto a contaminação e alterações ou degradações do RNA. O procedimento de uma única etapa de rompimento do VBig, extração e manutenção da integridade do RNA pelo uso do Trizol, adaptado do método de Chomczynski & Sacchi (1987), reduz estes problemas, tornando viável o tratamento de diversas amostras simultaneamente.

Outros autores (Lin et al., 1991; Jackwood et al., 1992) dosaram o RNA por espectrofotometria mas, conforme os resultados obtidos neste trabalho e a experiência do grupo de pesquisa em biologia molecular do Setor de Doenças das Aves, salvo em casos específicos, este procedimento é desnecessário porque não detecta concentrações mínimas de RNA, mas que podem ser transcritas para cDNA e amplificados pela RT-PCR.

5.3. SÍNTESE DE cDNA (DNA COMPLEMENTAR)

Tomando por base os resultados da PCR, onde as amostras de VBig (referência e brasileiras) mostraram amplificação específica esperada (438 pb.), exceto nos controles negativos, pode-se afirmar que a RT foi realizada com êxito neste trabalho.

5.4. AMPLIFICAÇÃO DO cDNA (PCR)

Os cDNAs obtidos pela reação de transcrição reversa foi igualmente amplificado pela PCR através do uso de oligonucleotídeos específicos (BIGN1 e BIGN2) para parte do gene N (Figura 6). Durante o experimento, foram testados diversos parâmetros no teste de PCR visando alcançar a amplificação de uma única banda específica de 438 pb., sendo esses a concentração de $MgCl_2$, quantidade de cDNA, número de ciclos, temperatura e tempo das diversas fases destes e temperatura de anelamento. Destas modificações a que

apresentou maior efeito no processo de otimização foi o número de ciclos, reduzindo de 44 até 26 ciclos e sendo testados além destes as repetições de 36, 31 e 29X, cuja a última foi a ideal para a amplificação de uma única banda específica, associada às outras condições ótimas da reação.

Em relação a temperatura de anelamento esta variou de 46 a 66°C, observando-se redução do número de bandas inespecíficas à medida que esta aumentava, alcançando o objetivo com 64°C. A temperatura de 66°C também apresentou o mesmo resultado, mas com o inconveniente da banda específica da amostra UK 6/82 ter quase desaparecido.

O efeito da quantidade de cDNA não pode ser estimado com precisão, pois este não foi diluído por não ter sido dosado previamente e por ser a variação das suas quantidades muito pequenas. Entretanto, houve diferença visível entre 1,5 μL e 1,0 μL de cDNA na reação de PCR, onde este apresentou menor número de bandas inespecíficas e as presentes mais fracas, quando o processo ainda não se encontrava completamente otimizada. Não houve diferença entre 1,0 e 0,5 μL de cDNA na reação, optando-se pelo primeiro devido a menor possibilidade erro de pipetagem. Além do cDNA, o produto de amplificação (amplicon) de todas as amostras foi testado nas mesmas quantidades deste, não apresentando bons resultados (maior número de bandas inespecíficas e banda específica mais fraca).

No caso da concentração do $MgCl_2$ a variação de 1,5 a 3,0 mM foi suficiente para determinar a melhor para este estudo, pois na concentração de 3 mM o número de bandas inespecíficas aumentou significativamente. A concentração de $MgCl_2$ escolhida foi de 2,0 mM devido a ausência de diferenças entre esta e a de 1,5 mM nas condições de 36 ciclos (primeiro ciclo: 94°C/4' e 72°C/3', demais ciclos: 92°C/1', 55°C/2' e 72°C/3') e de 26 ciclos (primeiro ciclo: 94°C/3', 52°C/2' e 72°C/3', demais ciclos: 92°C/1', 57°C/2' e 72°C/3'). Nas duas situações usou-se uma etapa de extensão final a 72°C/10'. Por ser a estringência maior nas condições ótimas da reação de PCR, optou-se pela concentração de 2,0 mM em detrimento da de 1,5 mM de $MgCl_2$.

concentração de 2,0 mM em detrimento da de 1,5 mM de $MgCl_2$.

Os outros parâmetros como, concentração de dNTPs e de oligos, não foram testados em diversas variações por estes apresentarem um ótimo resultado ao serem as outras condições otimizadas.

Alguns resultados desse processo de otimização da RT-PCR estão representados nas Figuras 4 e 5.

Em todas as reações de PCR, a banda de 438 pb. estava presente em todas as amostras de VBIG, tanto de referência quanto de isolados de campo, e ausente nos controles negativos (LA e VDN), sendo única somente nas condições ótimas mencionadas no item 4.6 de "Materiais e Métodos" e visualizada quando submetidos a eletroforese em gel de agarose 2 % corado com EtBr. (Figura 6). O mesmo resultado foi demonstrado em estudos anteriores, onde 18 (Zwaagstra et al., 1992), 41 (Adzhar et al., 1996) e 12 isolados (Wang & Tsai., 1996) foram detectados, usando os mesmos oligos. Estes eram originados da América do Norte,

Europa, Austrália, Japão, Oriente Médio e Taiwan.

O ano de isolamento, tipo de criação e sinais clínicos apresentados (tropismo) pelas amostras, não interferiram na detecção da parte estudada do gene N pelos oligos BIGN1 e BIGN2.

Apesar do oligo BIGN1 ter apresentado anelamento somente com a amostra M41 e não com outras de VBIG, quando submetido ao programa BLASTN, este foi detectado em todas as amostras de VBIG encontradas no GenBank quando analisado visualmente. Segundo o próprio programa de computador pequenas seqüências de nucleotídeos (menores que 20 pb.) e com baixa complexidade podem não apresentar complementariedade compatível com as diversas seqüências presentes no banco de dados, devido a um sistema de filtro presente neste e ao baixo valor de E (Expect). Sendo assim, seqüências com algum nucleotídeo diferente não são detectadas, o que na prática não afeta o anelamento dos oligos ao molde de cDNA, situação observada nas diversas amostras analisadas.

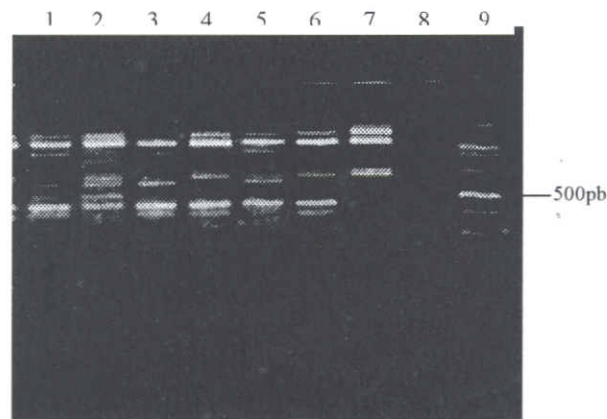


Figura 4 - Análise do gel de agarose 2% corado com brometo de etídio contendo os produtos da PCR realizada durante o processo de otimização da reação. Parâmetros: 1,5 μL de cDNA, *Taq* DNA polimerase e tampão PCR (Promega), temperatura de anelamento: 55°C/ 2', Ciclos: 43X. Ciclo inicial: 94°C/3', 95°C/2', 72°/ 3'. Canaletas 1: SE-17; 2: UK 6/82; 3: Ark-99; 4: Iowa 609; 5: H-52; 6: Iowa 97; 7: Controle negativo - VDN; 8: Controle negativo - LA; 9: Padrão de peso molecular DNA Ladder 100 pb (Promega).

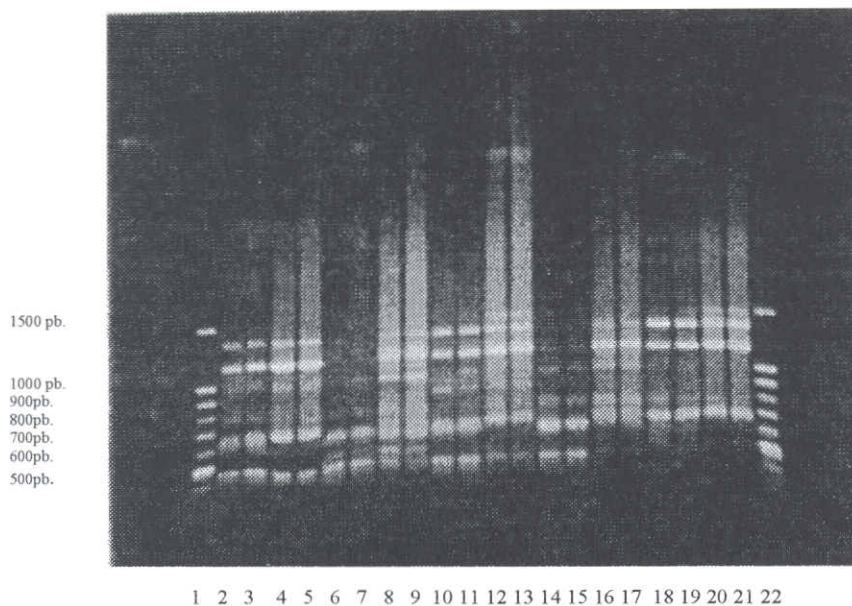


Figura 5 - Análise do gel de agarose 1% corado com brometo de etídio contendo os produtos da PCR realizada durante o processo de otimização. Parâmetros: 1,5 μ L de cDNA ou amplicon, 1,5 ou 2,0 mM de $MgCl_2$, *Taq* DNA polimerase e tampão PCR (Promega), temperatura de anelamento: 58°C/ 2', Ciclos: 35X. Ciclo inicial: 94°C/4', 72°/ 3', demais ciclos: 94]C/1', 58°C/2', 72°C/3'. Extensão final: 72°C/3'. Canaletas: 1: Padrão de peso molecular DNA Ladder 100 pb (Promega); 2: Amostra JMK (cDNA, 1,5 mM de $MgCl_2$); 3: JMK (cDNA, 2,0 mM de $MgCl_2$); 4: JMK (amplicon, 1,5 mM de $MgCl_2$); 5: JMK (amplicon, 2,0 mM de $MgCl_2$); 6: SE-17 (cDNA, 1,5 mM de $MgCl_2$); 7: SE-17 (cDNA, 2,0 mM de $MgCl_2$); 8: SE-17 (amplicon, 1,5 mM de $MgCl_2$); 9: SE-17 (amplicon, 2,0 mM de $MgCl_2$); 10: PM3 (cDNA, 1,5 mM de $MgCl_2$); 11: PM3 (cDNA, 2,0 mM de $MgCl_2$); 12: PM3 (amplicon, 1,5 mM de $MgCl_2$); 13: PM3 (amplicon, 2,0 mM de $MgCl_2$); 14: G (cDNA, 1,5 mM de $MgCl_2$); 15: G (cDNA, 2,0 mM de $MgCl_2$); 16: G (amplicon, 1,5 mM de $MgCl_2$); 17: G (amplicon, 2,0 mM de $MgCl_2$); 18: Controle negativo - VDN (cDNA, 1,5 mM de $MgCl_2$); 19: VDN (cDNA, 2,0 mM de $MgCl_2$); 20: VDN (amplicon, 1,5 mM de $MgCl_2$); 21: VDN (amplicon, 2,0 mM de $MgCl_2$); 22: Padrão de peso molecular DNA Ladder 100 pb. (Promega).

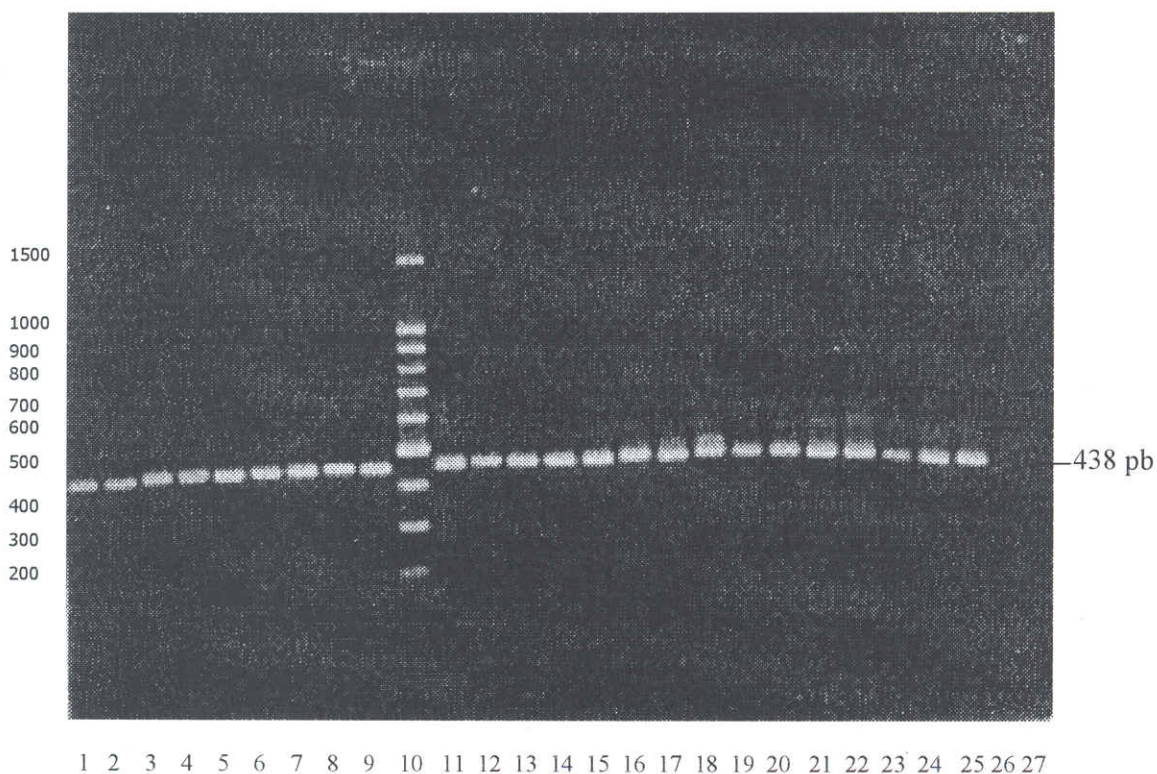


Figura 6 - Análise do gel de agarose 2% corado com brometo de etídio contendo os produtos da PCR obtidos das amostras de VBig (referência e brasileiras) testadas. Reação otimizada. Parâmetros utilizados: 1,0 μ L cDNA, 2,0 mM de $MgCl_2$, N^o de ciclos: 29. Ciclo inicial: 94°C/3', 58°C/2' e 72°C/3', demais ciclos: 94°C/1', 64°C/2', 72°C/3'. Extensão final: 72°C/10'. Canaletas 1: Amostra M41; 2: Conn A-5968; 3: JMK; 4: SE-17; 5: UK 6/82; 6: Ark-99; 7: Iowa 609; 8: H-52; 9: Iowa 97; 10: padrão de peso molecular DNA Ladder 100 pb (Promega); 11: 208; 12: 29-78; 13: 297; 14: 283; 15: 290; 16: 327; 17: 351; 18: 319; 19: PM1; 20: PM2; 21: PM3; 22: PM4; 23: G; 24: T II; 25: 200; 26: Controle negativo - VDN (La Sota); 27: Controle negativo - LA.

Todas as amostras brasileiras foram detectadas pelos oligos específicos para parte do gene N. A RT-PCR utilizada mostrou-se adequada para a identificação de pretensos isolados de VBIG.

restrição *Ava*II (Promega, EUA), para confirmação da natureza destes, gerando diversos fragmentos, os quais foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 2% corado em EtBr (Fig. 7).

5.5. ANÁLISE DE RFLP

Os produtos amplificados pela RT-PCR foram posteriormente digeridos com a enzima de

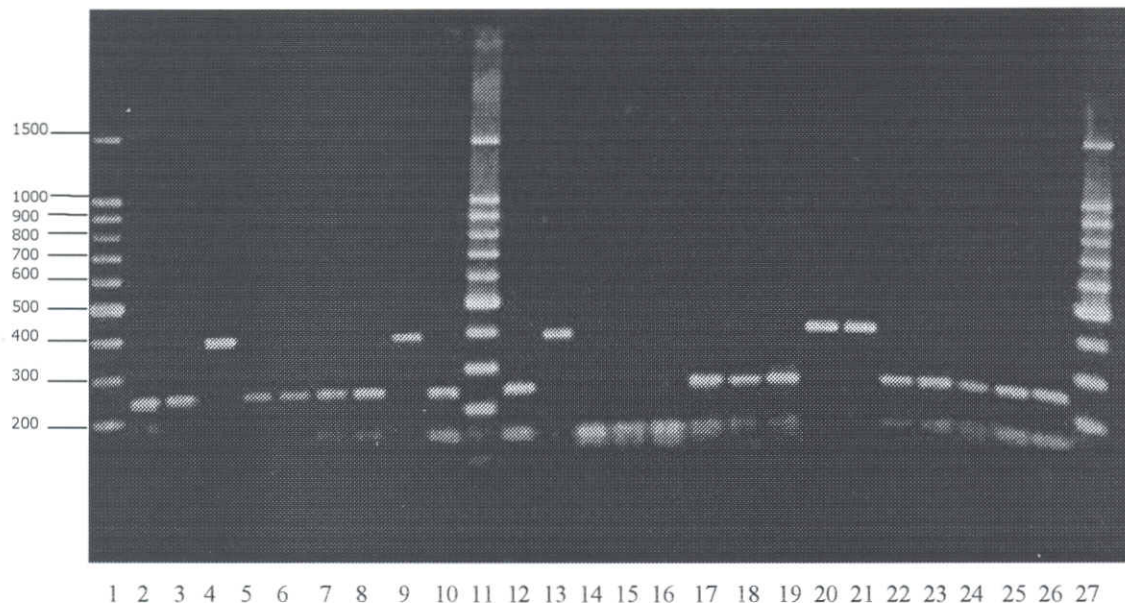


Figura 7 - Análise por RFLP em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio dos produtos amplificados (parte do gene N das amostras de VBIG - referência e brasileiras) por RT-PCR digeridos com *Ava*II. Canaletas 1, 11 e 27: Padrão de peso molecular DNA Ladder 100 pb; 2: M41; 3: Conn A-5968; 4: JMK; 5: SE-17; 6: UK 6/82; 7: Ark-99; 8: Iowa 609; 9: H-52; 10: Iowa 97; 12: 208; 13: 29-78; 14: 297; 15: 283; 16: 290; 17: 327; 18: 351; 19: 319; 20: PM1; 21: PM2; 22: PM3; 23: PM4; 24: G; 25: T II; 26: 200.

A Tabela 6 apresenta os padrões de corte de *AvaII*, nas seqüências das amostras coletadas no Gen Bank (e flanqueadas pelos oligos BIGN1 e

BIGN2) analisadas pelo programa de enzimas de restrição WebGene, e as utilizadas no presente estudo.

Tabela 6 - Agrupamento das amostras de VBIG [referências (GenBank + Estudo) e brasileiras] com base na análise de restrição enzimática da parte estudada do gene N.

Grupos	Ponto de corte* (mapa de restrição) (5' → 3')	Fragmentos em pb (5' → 3')	Amostras**		
			GenBank	Estudo	
				Referência	Brasileiras
1	139 / 137 / 79; 373 / 371 / 313.	138 / 136 / 78; 234 / 234 / 234; 66 / 68 / 126.	M41 / Beaudette / D1466.	M41 (A5968; UK 6/82; SE-17; Iowa 609; Iowa 97).	(200; 208; 319; 327; 351; PM3; PM4; G; TII)
2	64.	63, 375.	Q3/88.	JMK; H-52.	29-78; PM1; PM2.
3	61 / 41; 295 / 295.	60 / 40; 234 / 234; 144 / 164.	Ark-99 / GRAY / CU-T2 / VicS / V5/90.	Ark-99 (A5968; UK 6/82; SE-17; Iowa 609; Iowa 97).	(200; 208; 319; 327; 351; PM3; PM4; G; TII).
4	41; 62; 238; 275.	40, 21, 176, 37, 164.	N9/74.	----	283; 290; 297.
5	41 / 0 / 64; 63 / 63 / 89; 275 / 275 / 298.	40 / 0 / 63; 22 / 0 / 25; 0 / 62 / 0; 212 / 212 / 209; 164 / 164 / 141.	N1/62 (T) / N2/75 / N1/88.***	----	----

* Fonte: GenBank (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov) + WebGene (www.darwin.bio.geneseo.edu/~yin/WebGene).

** Amostras de VBIG publicadas no GenBank (sequenciamento) + mapa de restrição do WebGene e, informações sobre as amostras deste Estudo baseadas na eletroforese em gel de agarose 2% corado com EBr e análise em UV.

*** Amostras australianas isoladas de casos clínicos em lotes de frangos de corte.

Os dados obtidos da restrição enzimática com *AvaII* dos amplificadores (438 pb) das amostras de referência M41 e Ark-99 (Figura 7) confirmaram que os fragmentos estudados pertenciam à região esperada do gene N, conforme as informações obtidas no GenBank + WebGene (Tabela 6), os quais dão um alto grau de confiabilidade aos resultados deste trabalho. Também como subsídio à validação deste trabalho, houve coincidência de sítios de restrição entre as amostras Ark-99 e CU-T2, mesmo sendo estas amostras publicadas no GenBank de fontes (autores e trabalhos) diferentes, por ser a amostra CU-T2 uma recombinante de Ark-99 (porção amino terminal da nucleoproteína) e H-52 (porção carboxi terminal da mesma) (Jia et al., 1995).

Cinco amostras de referência (A5968; UK 6/82; SE-17; Iowa 609; Iowa 97) e nove brasileiras (200; 208; 319; 327; 351; PM3; PM4; G; TII) apresentaram bandas (ao redor de 240, 140 e 60

pb - Figura 7) parecidas com os fragmentos obtidos a partir dos mapas de restrição da mesma região do gene N das amostras M41 e Ark-99 (Tabela 6). As bandas em torno de 140 e 60 pb não foram visualizadas na foto apresentada neste trabalho, mas encontram-se presentes na fotografia original, porém fracas. Outras amostras de referência (JMK e H-52) e três brasileiras (29-78; PM1; PM2) apresentaram bandas [ao redor de 400 e 40 pb (visualizada na foto original mas não na apresentada neste trabalho) - Figura 7] parecidas com os fragmentos obtidos do mapa de restrição (WebGene) da mesma região do gene N (GenBank) da amostra nefropatogênica australiana Q3/88 (Sapats et al., 1996) (Tabela 6). As amostras brasileiras 283, 290 e 297 apresentaram bandas (ao redor de 170 pb - Figura 7) distintas dos fragmentos obtidos por digestão enzimática tanto das amostras de referência quanto das demais brasileiras, aproximando-se daqueles encontrados na

amostra australiana nefropatogênica N9/74 isolada de lotes de frangos de corte vacinados, publicada no GenBank (acesso U52597) (Tabela 6). Além disso, nessas amostras, bandas menores que 100 pb foram fracamente visíveis ao gel de agarose 2% corado com EtBr, mas difíceis de serem mensuradas quanto ao tamanho do fragmento e não visualizadas quando este foi fotografado em filme Polaroid.

Embora as amostras de referência H-52 e M41 pertençam ao mesmo sorotipo (Massachusetts), estas apresentaram mapas de restrição diferentes no presente estudo, sugerindo a presença de alguma alteração (recombinação ou mutação) nessa região do gene N estudada, a qual se repete nas amostras brasileiras 29-78, PM1 e PM2, requerendo estudos mais profundos para verificação do seu real parentesco. Uma hipótese levantada é de que estas amostras isoladas de surtos da BIG sejam a própria H-52, a qual é utilizada como vacina e é sabidamente patogênica, causando doença respiratória grave e muitas vezes seguida de síndrome nefrite-nefrose, quando galinhas ou frangos de corte sem imunidade ativa específica são expostos. O isolamento de amostras a partir de quadros clínicos da BIG pertencentes ou apresentando algum parentesco com as amostras vacinais têm sido extensivamente relatada (Cavanagh et al., 1990; Jia et al., 1995; Adzhar et al., 1996), seja por reversão da virulência do VBIG por passagens seriadas em aves susceptíveis (Saif, 1993; Wit et al., 1998) ou por recombinação entre amostras vacinais ou destas com amostras de campo (Kusters et al., 1989; Jia et al., 1995). Resultados semelhantes foram encontrados por Ikuta (1999), ao sequenciar o gene N completo das amostras M41 e Holland (não especificou o grau de adaptação a OEG/SPF), o qual observou pequenas alterações entre estas, atribuídas às origens diferentes das amostras (EUA e Europa, respectivamente).

Um agrupamento maciço do maior número das amostras de referência e brasileiras com mapas de restrição semelhantes à M41 mas com características de patogenia diversas, ou mesmo à Beaudette (primeira a ser isolada no mundo - 1936), confirmaram que as amostras mantiveram esta parte do gene N bastante conservada por todos estes anos, concordando com Sapats et al. (1996), os quais, ao compararem as amostras nefropatogênicas

australianas do grupo I (N9/74, VicS (vacinal), V5/90, N1/62 ("T"), N2/75) com as isoladas nos EUA, Europa e Japão num período de 30 anos e com os isolados do grupo II (N1/88; Q3/88 e V18/91), encontraram alta homologia na seqüência de aminoácidos (de 92,3 a 98,8 % e de 91,4 a 92,9 %, respectivamente) e confirmaram observações prévias sobre a tendência de conservação da seqüência desta proteína sobre um longo período de tempo independente das distâncias geográficas e pressões imunológicas. Apesar da nucleoproteína induzir resposta imune celular (células T CD8⁺) (Boots et al., 1991 a; Seo et al., 1997; Seo & Collisson, 1998), a pressão de seleção sobre o gene N é bem menor que a encontrada sobre as outras proteínas mais exteriorizadas (S1, S2, sM e M), além de que esta é fundamental para a replicação e brotamento do vírion e proteção do RNA viral, reafirmando a necessidade desta manter-se altamente conservada.

As amostras (G e TII - 1975; 283, 290 e 297 - 1983; 327 e 351 - 1983 e 1984 respectivamente; PM1 e PM2 - 1987; PM3 e PM4 - 1989) com mesmo mapa de restrição puderam ser agrupadas quanto ao ano de isolamento mas não quanto aos sinais clínicos encontrados, por não ser a antigenicidade diretamente relacionada com a patogenicidade, independente do gene avaliado (S1, S2, M, sM ou N) (Dhinakar Raj & Jones, 1997).

Devido às diferenças apresentadas nos mapas de restrição das amostras 283, 290 e 297 frente as amostras de referência e as demais brasileiras, é provável que estas sejam recombinantes, apesar de tal fato, se algum dia for comprovado como verdadeiro, não ter afetado a sua detecção pela RT-PCR utilizada. Isso já era esperado desde que Zwaagstra et al. (1992) demonstraram pequenas diferenças pelo seqüenciamento neste fragmento de N de 438 pb., incluindo os oligos BIGN1 e BIGN2, as quais possibilitaram a criação de uma árvore filogenética entre 18 isolados da Europa, EUA e Oriente Médio.

Considerando que o gene N não tem nenhum envolvimento com o gene S1 responsável pela sorotipificação, o máximo que este estudo pode determinar é o maior ou menor parentesco entre as amostras estudadas, sendo este entre as amostras brasileiras 200; 208; 319; 327; 351;

PM3; PM4; G e TII e as apresentadas nos grupos 1 e 3 (não sendo possível determinar em qual(is) grupo(s) real(is) estas se encaixam), as amostras 29-78; PM1 e PM2 com as do grupo 2 e as amostras 283; 290 e 297 com as do grupo 4 (Tabela 6). Por outro lado, a ausência de relação da proteína N com o sorotipo concorda com os resultados de estudos anteriores (Kusters et al., 1989; Lin et al., 1991; Zwaagstra et al., 1992; Jia et al., 1995) da recombinação independente de partes do genoma viral ou homóloga *in vivo*. Em princípio, a seqüência do gene N serve como uma etiqueta de identificação do vírus e reflete um dos componentes genéticos que contribuem para a diferenciação das amostras. Sendo assim, seriam necessários testes mais profundos (amplificação de todo o gene N com análise por RFLP com maior número de enzimas de restrição ou de seqüenciamento e alinhamento das seqüências) para confirmação dessas semelhanças encontradas entre as amostras brasileiras e as de referência, como também com as publicadas no GenBank.

6. CONCLUSÕES

O caráter universal da RT-PCR utilizada foi confirmado para as amostras de VBIg estudadas. A RT-PCR estudada mostrou-se adequada como ferramenta adicional para uso na identificação de isolados brasileiros do VBIg.

O uso da enzima de restrição *AvaII* permitiu agrupar as amostras em três grupos distintos, sendo esses: I - M41, A-5968, UK 6/82, Ark-99, SE-17, Iowa 609, Iowa, 97, 200, 208, 327, 351, 319, PM3, PM4, G, TII; II - JMK, H-52, 29-78, PM1, PM2 e III - 297, 290, 283.

As amostras 283, 290 e 297 apresentaram um padrão de corte pela enzima de restrição *AvaII* atípico, quando comparadas as de referência, e provavelmente, são recombinantes no tocante à parte do gene estudado

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADZHAR, A. SHAW, K., BRITTON, P. et al. Universal oligonucleotides for the detection of infectious bronchitis virus by the polymerase chain reaction. *Avian Pathol.*, v.25, p. 817-836, 1996.
- ADZHAR, A., GOUGH, R. E., HAYDON, D. et al. Molecular analysis of the 793/ B serotype of infectious bronchitis virus in Great Britain. *Avian Pathol.*, v. 26, p. 625-640, 1997.
- ALEXANDER, D. J., BRACEWELL, C. D., GOUGH, R. E. Preliminary evaluation of the hemagglutination and hemagglutination inhibition tests for avian infectious bronchitis virus. *Avian Pathol.*, v. 5, p. 125, 1976.
- 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.
- AMBALI, A. G. & JONES, R. C. Early pathogenesis of an enterotropic variant of IBV in chickens. *Avian Pathol.*, v. 34, p. 809-817, 1990.
- ANDERSON, R. & WONG, F. Membrane and phospholipid binding by murine coronavirus nucleocapsid N protein. *Virology*, v. 194, p. 224-232, 1993.
- ANDREASEN, J. R., JACKWOOD, M. W., HLIT, D. A. Polymerase chain reaction amplification of the genome of infectious bronchitis virus. *Avian Dis.*, v. 35, p. 216-220, 1991.
- BANNER, L. R. & LAI, M. M. C. Random nature of coronavirus RNA recombination in the absence of selection pressure. *Virology*, v. 185, p. 441-445, 1991.
- BARIC, R. S., NELSON, G. W., FLEMING, J. O. et al. Interactions coronavirus nucleocapsid protein and viral RNAs: implications for viral transcription. *J. Virol.*, v. 62, n. 11, p. 4280-4287, 1988.
- BAUDOX, P., BESNARDEAN, L., CARRAT, C. et al. Interferon alpha inducing property of coronavirus particles and pseudoparticles. *Adv. Exp. Med. Biol.*, v. 440, p. 337-386, 1998.
- BEAUDETTE, F. R. & HUDSON, C. B. Cultivation of the virus of infectious

- bronchitis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 43, n. 1, p. 51-60, 1937.
- BHATTACHARJEE, P. S., NAYLOR, C. J., JONES, R. C. A simple method for immunofluorescence staining of TOC for the rapid identification of IBV. *Avian Pathol.*, v. 23, p. 471-480, 1994.
- BHATTACHARJEE, P. S. & JONES, R. C. Susceptibility of organ cultures from chicken tissues for strains of infectious bronchitis virus isolated from the intestine. *Avian Pathol.*, v. 26, p. 553-563, 1997.
- BINGHAM, R. W. & ALMEIDA, J. D. Studies on the structure of a coronavirus - avian infectious bronchitis virus. *J. Gen. Virol.*, v. 36, p. 495-502, 1977.
- BLUM, H. E. Molecular diagnosis of microbial infections. *Biologicals*, v. 24, p. 193-195, 1996.
- BONNEFOY, L., BOUQUET, J. F., PICAULT, J. P. et al. Characterization of IBV variant strain PL 84084 isolated in France. *Adv. Exp. Med. Biol.*, v. 342, p. 395-398, 1994.
- BOOTS, A. M. H., KUSTERS, J. G., VAN DER ZEIJST, B.A. M. et al. The nucleocapsid protein of IBV comprises immunodominant determinants recognized by T-cells. *Adv. Exp. Med. Biol.*, v. 276, p. 189-197, 1990.
- BOOTS, A. M. H., VAN LIEROP, M. J., KUSTERS, J. G. et al. MHC class II-restricted T-cell hybridomas recognizing the nucleocapsid protein of avian coronavirus IBV. *Immunology*, v. 72, p. 10-14, 1991 a.
- BOOTS, A. M. H., KUSTERS, J. G., VAN NOORT, J. M. et al. Localization of a T-cell epitope within the nucleocapsid protein of avian coronavirus. *Immunology*, v. 74, p. 8-13, 1991 b.
- BOOTS, A. M., BENAÏSSA-TROUW, B. J., HESSELINK, W. et al. Induction of antiviral immune responses by immunization with recombinant-DNA encoded avian coronavirus nucleocapsid protein. *Vaccine*, v. 10, n. 2, p. 119-124, 1992.
- BOURSNELL, M. E. & BROWN, T. D. Sequencing of coronavirus IBV genomic RNA: a 195 - base open reading frame encoded by mRNA B. *Gene*, v. 29, n. 1-2, p. 87-92, 1984.
- BOURSNELL, M. E. G., BINNS, M. M., FOULDS, I. J. et al. Sequences of the nucleocapsid genes from two strains of avian infectious bronchitis virus. *J. Gen. Virol.*, v. 66, p. 573-580, 1985 a.
- BOURSNELL, M.E. G., BINNS, M. M., BROWN, D. K. Sequencing of coronavirus IBV genomic RNA: three open reading frames in the 5' "unique" region of in RNA D. *J. Gen. Virol.*, v. 66, p. 2253-2258, 1985 b.
- BOURSNELL, M. E. G., BROWN, T. D. K., FOULDS, I. J. 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.
- BRANCO, J. A. D. Programas de vacinação, monitoramento e perfil sorológico para matrizes. In: Conferência APINCO 1991 de Ciência e Tecnologia Avícolas, 1991, Campinas, *Anais...* Campinas: 1991. p. 145-151.
- BREDENBEEK, P. J., CHARITE, J., NOTEN, J. F. A. et al. Sequences involved in the replication of coronaviruses. *Adv. Exp. Med. Biol.*, v. 218, p. 65-72, 1987.
- BRIERLEY, I., BOURSNELL, M. E. G., BINNS, M. M. et al. Products of the polymerase-encoding region of the coronavirus IBV. *Adv. Exp. Med. Biol.*, v. 276, p. 275-280, 1987.
- BRL, **Instruction Manual Gibco BRL - Horizon 11•14 and 20•25 gel electrophoresis apparatus**, Life Technologies CAT SERIES 11068 & 21069, 1998, 18 p.
- BRL, **Instruction Manual Gibco BRL, SuperScript™ Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis**, Life Technologies. CAT. No 18089-011, 1999, 33 p.

- BROWN, T. D. K., BOURSNELL, M. E. G., BINNS, M. M. A leader sequence is present on mRNA A of avian infectious bronchitis virus. *J. Gen. Virol.*, v. 65, p. 1437-1442, 1984.
- BROWN, T. D. K., BOURSNELL, M. E. G., BINNS, M. M. et al. Cloning and sequencing of 5' terminal sequences from avian infectious bronchitis virus genome RNA. *J. Gen. Virol.*, v. 67, p. 221-228, 1986.
- CARDOSO, T. C., SOUSA, R. L. M. C., PINTO, A. A. et al. Padronização do sandwich ELISA com bloqueio de fase líquida para detecção de anticorpos contra o vírus da bronquite infecciosa das aves. In: Conferência APINCO 1997 de Ciência e Tecnologia Avícolas, 1997, São Paulo. *Anais...* São Paulo: 1997. p. 54.
- CARDOSO, T. C., SOUSA, R. L., PINTO, R. L. M. et al. Estudo comparativo entre diferentes métodos de ELISA ("enzyme linked immunosorbente assay") e a técnica convencional de soroneutralização na detecção de anticorpos contra o vírus da bronquite infecciosa das aves. In: Conferência APINCO 1998 de Ciência e Tecnologia Avícola, 1998, Campinas. *Trabalhos de pesquisa*, Campinas: 1998. p. 62.
- CASE, J. T.; BICKFORD, A. A., ARDANS, A. A. Identification by a monoclonal antibody of a neutralizing epitope on the nucleocapsid protein of IBV. In: KALETA, E. F. & HEFFELS-REDMANN. *Proceedings I International Symposium on Infectious Bronchitis*, 1988, Rauschholzhausen, Germany. *Anais...* Rauschholzhausen: 1988. p.146.
- CAVANAGH, D. Structural polipeptides of coronavirus IBV. *J. Gen. Virol.*, v. 53, n. 1, p. 93-103, 1981.
- CAVANAGH, D. Coronavirus IBV: further evidence that the surface projections are associated with two glycopolypeptides. *J. Gen. Virol.*, v. 64, p. 1787-1791, 1983.
- CAVANAGH, D. & DAVIS, P. Properties of coronavirus IBV after removal of the S1 subunit of the spike glycoprotein. *Adv. Exp. Med. Biol.*, v. 218, p. 501-507, 1987.
- CAVANAGH, D. & BROWN, T. D. K. Aspects of coronavirus evolution. *Adv. Exp. Med. Biol.*, v. 276, p. 367-368, 1990.
- CAVANAGH, D., DAVIS, P. COOK, J. et al. Molecular basis of the variation exhibited by avian infectious bronchitis coronavirus (IBV). *Adv. Exp. Med. Biol.*, v. 276, p. 369-372, 1990.
- CAVANAGH, D. & DAVIS, P. J. Sequence analysis of strains of avian infectious bronchitis coronavirus isolated during the 1960s in the U.K. *Arch. Virol.*, v.130, p.471-476, 1992.
- CAVANAGH, D., SHAW, K., XIAOYAN, Z. Analysis of messenger RNA within virions of IBV. *Adv. Exp. Med. Biol.*, v. 342, p. 123-128, 1993.
- CAVANAGH, D., ELLIS, M. M., COOK, J. K. A. Relationship between sequence variation in the S1 spike protein of infectious bronchitis virus and the extent of cross-protection in vivo. *Avian Pathol.*, v. 26, p. 63-74, 1997.
- CAVANAGH, D. & NAQI, S. A. Infectious bronchitis. In: CALNEK, B. W. et al., eds. *Diseases of Poultry*, 10^o ed. Ames: Iowa State University Press, 1997. p. 511-526.
- CAVANAGH, D., MAWDITT, K., ADZHAR, A. et al. Does IBV change slowly despite the capacity of the spike protein to vary greatly? *Adv. Exp. Med. Biol.*, v. 440, p. 729-734, 1998.
- CHEN, B. Y., HOSI, S., ITAKURA, C. Histopathology and immunohistochemistry of renal lesions due to an infectious bronchitis virus in chicks. *Avian Pathol.*, v. 25, p. 269-283, 1996.
- CHERRY, J. D. & TAYLOR-ROBINSON, D. Large-quantity production of chicken, embryo tracheal organ cultures and use in

- virus and Mycoplasma studies. *Appl. Microb.*, v. 19, n. 4, p. 658-662, 1970.
- CHOMCZYNSCHI, P. & SACCHI, N. Single-step of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, v. 162, n. 1, p. 156-159, 1987.
- COLLINS, A. R., KNOBLER, R. L., POWELL, H. et al. Monoclonal antibodies to murine hepatitis virus - 4 (strain JHM) define the viral glycoprotein responsible for attachment and cell-cell fusion. *Virology*, v. 119, p. 358-371, 1982.
- COLLISSON, E. W., LI, J., SNEED, L. W. et al. Detection of avian infectious bronchitis viral infection using in situ hybridization and recombinant DNA. *Vet. Microbiol.*, v.24, p. 261-271, 1990 a.
- COLLISSON, E. W., WILLIAMS, A. K., HAAR, R. V. et al. Sequence comparisons of the 3' end of the genomes of five strains of avian infectious bronchitis virus. *Adv. Exp. Med. Biol.*, v. 276, p. 373-377, 1990 b.
- COLLISSON, E. W., WILLIAMS, A. K., CHUNG, S. I. et al. Interactions between the IBV nucleocapsid protein and RNA sequences specific for the 3' end of the genome. *Adv. Exp. Med. Biol.*, v. 380, p. 523-528, 1995.
- COLOGNA, R. & HOGUE, B. G., Coronavirus nucleocapsid protein-RNA interactions. *Adv. Exp. Med. Biol.*, v. 440, p. 355-359, 1998.
- COOK, J. K. A. The classification of new serotypes of infectious bronchitis virus isolated from poultry flocks in Britain 1981 and 1983. *Avian Pathol.*, v.13, p.733-41, 1984.
- CORIA, M. F., & RICHTIE, A. E. Serial passage of 3 strains of infectious bronchitis virus in african green monkey kidney cells (VERO). *Avian Dis.*, v. 17, p. 697-704, 1973.
- COUTINHO, M. D. B. Programa de vacinação, monitoramento e perfil sorológico para frangos. In: Conferência APINCO 1991 de Ciência e Tecnologia Avícolas, 1991, Campinas, *Anais...* Campinas: 1991. p. 153-158.
- 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.
- CUMMING, R. B. Infectious avian nephrosis (uraemia) in Australia. *Aust. Vet. Journal*, v. 39, n. 4, p. 145-147, 1963.
- CUMMING, R. B. Studies on Australian infectious bronchitis virus IV. Apparent farm-to-farm airborne transmission of infectious bronchitis virus. *Avian Dis.*, v. 14, p. 191-195, 1970.
- DALTON, K., PÉNZES, Z., WROE, C. et al. Sequence elements involved in the rescue of IBV defective RNA CD-91. *Adv. Exp. Med. Biol.*, v. 440, p. 253-257, 1998.
- DARBYSHIRE, J. H., ROWELL, J. G., COOK, J. K. A 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.
- DARBYSHIRE, J. H. Immunity to avian infectious bronchitis virus. In: *Avian Immunol.* Edinburgh: British Poultry Science Ltd., p.205-224, 1981.
- DAVIES, H. A., DOURMASHKIN, R. R., MACNAUGHTON, M. R. et al. Ribonucleoprotein of avian infectious bronchitis virus. *J. Gen. Virol.*, v.53, p.67-74, 1981.
- DHINAKAR RAI, G. & JONES, R. C. Immunopathogenesis of infection in SPF chicks and commercial broiler chickens of a 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 the chicken. *Avian Pathol.*, v. 26, p. 677-706, 1997.
- DI FÁBIO, J. Bronquite infecciosa das galinhas: aspectos clínicos e controle da BIG no Brasil. In: Conferência Apinco 1993 de Ciência e Tecnologia Avícolas, 1993, Santos, *Anais...* Santos: 1993. p. 01 - 08, 1993.
- EPIPHANIO, E. O.B. Cultivos de anéis de traquéia para ensaios com o vírus da bronquite infecciosa das galinhas. Belo Horizonte: Escola de Veterinária da UFMG, 1998, 73 p, (*Tese, Mestrado*).
- ERBECK, D. H. & McMURRAY, B. L. Isolation of Georgia variant (Georgia isolate 1992) infectious bronchitis virus but not *Ornithobacterium rhinotracheale* from a Kentucky broiler complex. *Avian Dis.*, v. 42, p. 613-617, 1998.
- FALCONE, E., D'AMORE, E., TRANI, L. et al. Rapid diagnosis of avian infectious bronchitis virus by the polymerase chain reaction. *J.Virol. Meth.*, v.64, p.125-130, 1997.
- FOSMIRE, J. A., HWANG, K., MAKINO, S. Identification and characterization of a coronavirus packaging signal. *J. Virol.*, v. 66, n. 6, p. 3522-3530, 1992.
- GELB, J. Complexo respiratório em frangos de corte. In: Conferência APINCO 1988 de Ciência e Tecnologia Avícolas, 1988, Campinas, *Anais...* Campinas: 1988. p. 131-139.
- GELB, J., WOLFF, J. B., MORAN, C. A. Variant serotypes of infectious brochitis virus isolated from commercial layer and broiler chickens. *Avian Dis.*, v. 35, p. 82-87, 1991.
- GOUGH, R. E., RANDALL, C. J. DAGLESS, M. et al. A "new" strain of infectious bronchitis virus infecting domestic fowl in Great Britain. *The Vet. Rec.*, v. 130, p. 493-494, 1992.
- HAAN, C. A., VENNEMA, H., ROTTIER, P. J. M. Coronavirus envelope assembly is sensitive to changes in the terminal regions of the viral M protein. *Adv. Exp. Med. Biol.*, v. 440, p. 367-375, 1998.
- HANDBERG, K. J., NIELSEN, O. L., PEDERSEN, M. W. et al. Detection and strain differentiation of infectious bronchitis virus in tracheal tissues from experimentally infected chickens by reverse transcription - polymerase chain reaction. Comparison with a immunohistochemical technique. *Avian Pathol.*, v. 28, n. 4, p. 327-335, 1999.
- HIPÓLITO, O., Spectrophotometric and serum neutralization studies of sera from chickens exposed to infectious bronchitis virus. *Arquivo da Escola de Veterinária*. Belo Horizonte-Minas Gerais, v.10, p.179-224, 1957.
- HIPÓLITO, O. Estudo de duas amostras de vírus isoladas de casos de aves com a síndrome nefrite-nefroze. *Ciência & Cultura*, v. 25, n. 6, p. 609, 1973.
- HIPÓLITO, O., LAMAS DA SILVA, J. M., HSIUNG, H. M. et al. *Bronquite infecciosa das galinhas - A doença no Brasil*. Brasil. 1979 - 72 p.
- HOLMES, H. C. & FINNEY, P. M. Haemagglutination inhibition antibody titres in chickens vaccinated with infectious bronchitis virus virus vaccines. *The Vet. Rec.*, v. 116, p. 587-588, 1985.
- HOLMES, K. V. & WILLIAMS, R. K. Functions of coronavirus glycoproteins. *Adv. Exp. Med. Biol.*, v. 276, p. 5-7, 1990.
- HOLMES, K. V. & LAI, M. C. Coronaviridae: the viruses and their replication. In: Fields, B.N. et al, eds. *Virology*, 3^{ed}. Philadelphia: Lippincott- Raven Publishers, v. 1, p. 1075-1101, 1996.

- 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.
- IEVEN, M. & GOOSSENS, H. Relevance of nucleic acid amplification techniques for diagnosis of respiratory tract infections in the clinical laboratory. *Clin. Microb. Reviews*, v. 10, n. 2, p.242-256, 1997.
- IGNJATOVIC, J. & McWATTERS, P. G. Monoclonal antibodies to three structural proteins of avian infectious bronchitis virus: characterization of epitopes and antigenic differentiation of Australian strains. *J. Gen. Virol.*, v. 72, p. 2915-2922, 1991.
- IGNJATOVIC, J. & GALLI, L. Structural proteins of avian infectious bronchitis virus: role in immunity and protection. *Adv. Exp. Med. Biol.*, v. 342, p. 449-453, 1994 a.
- IGNJATOVIC, J. & GALLI, L. The S1 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 b.
- 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., SAPATS, S. I., ASHTON, F. A long-term study of Australian infectious bronchitis viruses indicates a major antigenic change in recently isolated strains. *Avian Pathology*, v. 26, p. 535-552, 1997.
- IKUTA, N. Diagnóstico de doenças em aves através da biologia molecular. In: Conferência APINCO 1999 de Ciência e Tecnologia Avícola, 1999, Campinas, *Anais...* Campinas: 1999. p. 103-114.
- JACKWOOD, M.W., KWON, H. M., HILT, D. A Infectious bronchitis virus detection in allantoic fluid using the polymerase chain reaction and a DNA probe. *Avian Dis.*, v. 36, p. 403 - 409, 1992.
- JACKWOOD, M. W., YOUSEF, N. M., HILT, D. A. Further development and use of a molecular serotype identification test for infectious bronchitis virus. *Avian Dis.*, v. 41, p. 105-110, 1997.
- JANSE, E. M., ROOZELAAR, D. V., KOCH, G. Leukocyte subpopulations in kidney and trachea of chickens infected with infectious bronchitis virus. *Avian Pathol.*, v. 23, p. 513-523, 1994.
- JEONG, Y. S. & MAKINO, S. Mechanism of coronavirus transcription: duration of primary transcription initiation activity and effects of subgenomic RNA transcription on RNA replication. *J. Virol.*, v. 66, n. 6, p. 3339-3346, 1992.
- JEONG, Y. S. & MAKINO, S. Evidence for coronavirus discontinuous transcription. *J. Virol.*, v. 68, p. 2615-2623, 1994.
- JIA, W., KARACA, K., PARRISH, C. R. et al. A novel variant of avian infectious bronchitis virus resulting from recombination among three different strains. *Arch. Virol.*, v. 140, n. 2, p. 259-271, 1995.
- JIA, W. & NAQI, S. A. Sequence analysis of gene 3, gene 4 and gene 5 of avian infectious bronchitis virus strain CU-T2. *Gene*, v. 189-193, 1997.
- KARACA, K., NAQI, S. A., PALUKAITIS, P. et al. Serological and molecular characterization of three enteric isolates of infectious bronchitis virus of chickens. *Avian Dis.*, v. 34, p. 899-904, 1990.
- KIM, K. H., NARAYANAN, K., MAKINO, S. Characterization of coronavirus DI RNA packaging. *Adv. Exp. Med. Biol.*, v. 440, p. 347-353, 1998.
- KLUMPERMAN, J., LOCKER, J. K., MEIJER, A. et al. Coronavirus M proteins accumulate in the Golgi complex beyond the site of virion budding. *J. Virol.*, v. 68, p. 6523-6534, 1994.

- KOCH, G., HARTOG, L., KANT, A. et al. Antigenic domains on the peplomer protein of avian infectious bronchitis virus: correlation with biological functions. *J. Gen. Virol.*, v. 71, p. 1929-1935, 1990.
- KOCH, G. & KANT, A. Binding of antibodies that strongly neutralise infectious bronchitis virus is dependent on the glycosylation of the viral peplomer protein. *Adv. Exp. Med. Biol.*, v. 276, p. 143-150, 1990.
- KUSTERS, J. G., NIESTERS, H. G. M., LENSTRA, J. A. et al. Phylogeny of antigenic variants of avian coronavirus IBV. *Virology*, v. 169, p. 217-221, 1989.
- KWON, H. M., JACKWOOD, M. W., GELB, J. Differentiation of infectious bronchitis virus serotypes using polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. *Avian Dis.*, v. 37, p. 194-202, 1993a.
- KWON, H. M., JACKWOOD, M. W., BROWN, T. P. et al. Polymerase chain reaction and a biotin-labeled DNA probe for detection of infectious bronchitis in chickens. *Avian Dis.*, v. 37, p. 149-156, 1993 b.
- LAI, M. M. C. & CAVANAGH, D. The molecular biology of coronavirus. *Adv. Virus Res.*, v. 18, p. 1-100, 1997.
- LAMAS DA SILVA, J. M. Complexo respiratório em frangos de corte - a experiência brasileira. In: Conferência APINCO 1988 de Ciência e Tecnologia Avícolas, 1988, Campinas, *Anais... Campinas: 1988.* p. 141-150, 1988.
- LAMAS DA SILVA, J. M. Bronquite infecciosa das galinhas: como e quando introduzir novas vacinas. In: Conferência APINCO 1989 de Ciência e Tecnologia Avícolas, 1989, Campinas, *Anais... Campinas: 1989.* p. 75-79.
- LAMONTAGNE, L., MAROIS, P., MARSOLAIS, G. et al. Inner structures of some coronavirus. *Can. J. Comp. Med.*, v. 45, p. 177-181, 1981.
- LAPPS, W., HOGUE, B. G., BRIAN, D.A. Sequence analysis of the bovine coronavirus nucleocapsid and matrix protein genes. *Virology*, v. 157, p. 47-57, 1987.
- LASHGARI, M. S. & NEWMAN, J. A. Preparing haemagglutination antigen from isolates of infectious bronchitis virus. *Avian Dis.*, v. 26, p. 508-519, 1982.
- LAUDE, H. Mapping epitopes on coronavirus glycoproteins. *Adv. Exp. Med. Biol.*, v. 276, p. 139-142, 1990.
- LAVIADA, M. D., VIDEGAIN, S. P., MORENO, L. et al. Expression of swine transmissible gastroenteritis virus envelope antigens on the surface of infected cells. Epitopes externally exposed. *Virus Res.*, v. 16, p. 247-254, 1990.
- LIN, Z., KATO, A., KUDOU, Y. 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, D. X., CAVANAGH, D., GREEN, P. et al. A polycistronic mRNA specified by the coronavirus infectious bronchitis virus. *Virology*, v. 184, p. 531-544, 1991.
- LIU, D. X. & INGLIS, S. C. Association of the infectious bronchitis virus 3c protein within the virion envelope. *Virology*, v. 185, p. 911-917, 1991.
- LIU, D. X. & INGLIS, S. C. Identification of two new polypeptides encoded by mRNA5 of the coronavirus infectious bronchitis virus. *Virology*, v. 186, p. 342-347, 1992 a.
- LIU, D. X. & INGLIS, S. C. Internal entry of ribosomes on a tricistronic mRNA encoded by infectious bronchitis virus. *J. Virol.*, v. 66, n. 10, p. 6143-6154, 1992 b.
- LIU, D. X., XU, H. Y., LIM, K. P. Regulation of mRNA I expression by the 5'-untranslated region (5'-UTR) of the coronavirus infectious bronchitis virus (IBV). *Adv. Exp. Med. Biol.*, v. 440, p. 303-311, 1998.

- LOMNICZI, B. Biological properties of avian coronavirus RNA. *J. Gen. Virol.*, v. 36, p. 531-533, 1977.
- LUKERT, P. D. Infectious bronchitis. In: HITCHNER, S. B., DOMERMUTH, C. H., PURCHASE, H. G. et al., eds. **Isolation and identification of avian pathogens, USA**: Am. Assoc. Avian Pathol., 1975. p. 182-188.
- LUNGE, V. R., IKUTA, N., FONSECA, A. S. K. et al. Caracterização de variantes do vírus da bronquite infecciosa (IBV). In: Conferência APINCO 1998 de Ciência e Tecnologia Avícola, 1998, Campinas, **Trabalhos de pesquisa**. Campinas: 1998. p. 50.
- MACNAUGHTON, M. R. & DAVIES, H. A. Ribonucleoprotein-like structures from coronavirus particles. *J. Gen. Virol.*, v. 39, p. 545-549, 1978.
- MARQUARDT, W. W. Infectious bronchitis: detection of viral antigen in eggs and antibodies in chicken serum by complement-fixation. *Avian Dis.*, v. 18, p. 105-110, 1974.
- MARQUARDT, W. W., SNYDER, D. B., SCHLOTTHOBER, B. A. detection and quantification of antibodies to infectious bronchitis virus by enzyme-linked immunosorbent assay. *Avian Dis.*, v. 25, p. 713-722, 1981.
- MARTINS, N. R. S., RESENDE, J. S., SOUZA, M. B. et al. Avaliação parcial de isolados do vírus de bronquite infecciosa das galinhas. In: Conferência APINCO 1996 de Ciência e Tecnologia Avícolas, 1996, Curitiba, **Anais...** Curitiba: 1996. p. 98.
- MASTERS, P. S. & STURMAN, L. S. Functions of the coronavirus nucleocapsid protein. *Adv. Exp. Med. Biol.*, v. 276, p. 235-238, 1990.
- McMARTIN, D. A. Infectious bronchitis. In: McFERRAN, J. B., McNULTY, M. S., eds. **Virus infections of birds**, Amsterdam: Elsevier Science Publishers B. V., 1993. v. 4, p. 247-275.
- MOCKETT, A. P. A. & DARBYSHIRE, J. H. Comparative of the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), haemagglutination inhibition test and agar gel precipitation test for detection of antibodies to avian infectious bronchitis virus. *Avian Pathol.*, v. 10, p. 1-10, 1981.
- MOCKETT, A. P. A., CAVANAGH, D., BROWN, T. D. K. Monoclonal antibodies to the S1 spike and membrane proteins of avian infectious bronchitis virus coronavirus strain Massachusetts M41. *J. Gen. Virol.*, v. 65, p. 2281-2286, 1984.
- MONTASSIER, H. J., BRONZONI, R. V. M., PINTO, A. A. et al. Detecção rápida do vírus da bronquite infecciosa através do método do ELISA competitivo (C-ELISA). In: Conferência APINCO 1998 de Ciência e Tecnologia Avícola, 1998, Campinas, **Trabalhos de pesquisa**. Campinas: 1998. p. 58.
- MOORE, K. M., JACKWOOD, M. W., HILT, D. A. Identification of amino acids involved in a serotype and neutralization specific epitope within the S1 subunit of avian infectious bronchitis virus. *Arch. Virol.*, v. 142, p. 2249-2256, 1997.
- MOVING, V., CZIFRA, G., RENSTRÖM, L. A monoclonal antibody blocking ELISA for detection of IBV antibodies in fowl. *Adv. Exp. Med. Biol.*, v. 440, p. 495-500, 1998.
- MURRAY, P. R., DREW, W. L., KOBAYASHI, G. S. et al. Coronavirus. **Microbiologia Médica**. RJ: Guanabara Koogan, 1992. p. 440-442.
- NAKANAGA, K., YAMANOUCHI, K., FUJIWARA, Protective effect of monoclonal antibodies on lethal mouse hepatitis infection in mice. *J. Virol.*, v. 59, p. 168, 1986.
- NAQI, S. A., KARACA, K., BAUMAN, B. A Monoclonal antibody-based antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay for identification of infectious bronchitis virus serotypes. *Avian Pathol.*, v. 22, p. 555-564, 1993.

- NDIFUNA, A., WATERS, A.K., ZHOU, M. et al. Recombinant nucleocapsid protein is potentially an inexpensive, effective serodiagnostic reagent for infectious bronchitis virus. *J. Virol. Meth.*, v. 70, p. 37-44, 1998.
- NGUYEN, V-P. & HOGHE, B. G., Protein interactions during coronavirus assembly. *J. Virol.*, v. 71, n. 12, p. 9278-9284, 1997.
- NGUYEN, V-P. & HOGUE, B. G. Coronavirus envelope glycoprotein assembly complexes. *Adv. Exp. Med. Biol.*, v. 440, p. 361-365, 1998.
- NIESTERS, B. **Molecular epidemiology of infectious bronchitis virus.** Donderdag, Netherlands: Utrecht, 1987, 77p. (*Tese, Doutorado*).
- OTSUKI, K., MATSUO, K., MAEDA, N. et al. Selection of variants of avian infectious bronchitis virus showing tropism for different organs. *Adv. Exp. Med. Biol.*, v. 276, p. 379-384, 1990.
- PANIAGO, M. T. **Atividade hemaglutinante de amostras do vírus da bronquite infecciosa das galinhas isoladas no Estado de Minas Gerais.** Belo Horizonte: Escola de Veterinária da UFMG, 1994, 44p. (*Tese, Mestrado*).
- PÉNZES, Z., TIBBLES, K., SHAW, K. et al. Characterization of replicating and packaged defective RNA of avian coronavirus infectious bronchitis virus. *Virology*, v.203, p.286-293, 1994.
- PÉNZES, Z., WROE, C., BROWN, T. D. K. et al. Replication and packaging of coronavirus infectious bronchitis virus defective RNAs lacking a long open reading frame. *J. Virol.*, v. 70, n. 12, p. 8660-8668, 1996.
- PFEFFER, M., WIEDMANN, M., BATT, C. A. et al. Review - Applications of DNA amplification techniques in veterinary diagnostics. *Vet. Res. Commun.*, v. 19, p. 375-407, 1995.
- RESENDE, J. S. **Patogenia comparada de duas amostras brasileiras do vírus da bronquite infecciosa das galinhas (BIG) em aves gnotobióticas (GN) e isentas de patógenos (SPF).** Belo Horizonte: Escola de Veterinária da UFMG, 1983, 74 p. (*Tese, Mestrado*).
- RESENDE, J. S., FLATSCHART, A. V. F., FLATSCHART, R. B. et al. Detecção do vírus da bronquite infecciosa das galinhas por PCR. In: XVI Encontro de Pesquisa da Escola de Veterinária. UFMG: BH-MG. *Anais...* BH: 1998. p. 58.
- ROMERO, C. H., BRENTANO, L., ROWE, C. A. et al. Ocorrência de anticorpos para vírus aviários em frangos de corte em região de intensa produção avícola. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 9, n. 1/2, p. 1-7, 1989.
- ROTTIER, P. J. M., WELLING, G. W., WELLING-WESTER, S. et al. Predicted membrane topology of the coronavirus protein E1. *Biochemistry*, v. 25, p. 1335-1339, 1986.
- SAIF, L. J. Coronavirus immunogens. *Vet. Microbiol.*, v. 37, p. 285-297, 1993.
- SAIKI, R. K. The design and optimization of the PCR. **PCR Technology - Principles and Applications for DNA Amplification**, p. 7-16, 1989.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual.** In: FORD, N. et al., 2 ed. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989., v.02, 1-47 p.
- SANDER, J. E., JACKWOOD, M. W., ROWLAND, G. N. Protection by a commercial Arkansas-type infectious bronchitis virus vaccine against a field isolate of the same serotype. *Avian Dis.*, v. 41, p. 964-967, 1997.
- SAPATS, S. I., ASHTON, F., WRIGHT, P. J. et al. Novel variation in the N protein of avian infectious bronchitis virus. *Virology*, v. 226, n. 15 (2), p. 412-417, 1996.

- SEO, S. H. & COLLISSON, E. W. Specific cytotoxic T lymphocytes are involved in vivo clearance of infectious bronchitis virus. **J. Virol.**, v. 71, n. 7, p. 5173-5177, 1997.
- SEO, S. H., WANG, L., SMITH, R. et al. The carboxil-terminal 120-residue polypeptide of infectious bronchitis virus nucleocapsid induces cytotoxic T lymphocytes and protects chickens from acute infection. **J. Virol.**, v. 71, n. 10, p. 7889-7894, 1997.
- SEO, S. H. & COLLISSON, E. W. Cytotoxic T lymphocyte responses to infectious bronchitis virus infection. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 440, p. 455-460, 1998.
- SETHNA, P. B., HUNG, S-L., BRIAN, D. A. Coronavirus subgenomic replicons as a mechanism for mRNA amplification. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 276, p. 335-340, 1990.
- SETHNA, P. B., HOFMANN, M. A., BRIAN, D.A. Minus-strand copies of replicating coronavirus mRNAs contain antileaders. **J. Virol.**, v. 65, p. 320-325, 1991.
- SHIZUYO, S., SEIJI, S., OKABE, T. et al. Cloning and sequencing of genes encoding structural proteins of avian infectious bronchitis virus. **Virology**, v. 165, p. 589-595, 1988.
- SMITH, A. R., BOURSNEILL, M. E. G., BINNS, M. M. et al. Identification of a new gene product encoded by mRNA D of infectious bronchitis virus. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 218, p. 47-54, 1987.
- SMITH, J. A. A clinical approach to bronchitis. In: VILLEGAS, P. In: IX Seminário Internacional de Patologia Aviar - Memórias. 1998, Georgia, **Anais...** Georgia: 1998. p. 402-11.
- SONG, C. S., LEE, Y. J., KIM, J-H et al. Epidemiological classification of infectious bronchitis virus isolated in Korea between 1986 and 1997. **Avian Pathol.**, v. 27, p. 409-416, 1998.
- SOUZA, M. B. **Afinidades antigênicas de amostras de campo do vírus da bronquite infecciosa das galinhas com a amostra Massachusetts M41.** Belo Horizonte: Escola de Veterinária da UFMG, 1999, 75 p. (*Tese, Mestrado*).
- STERN, D. F. & KENNEDY, S. I. T. Coronavirus multiplication strategy. I. Identification and characterization of virus-specified RNA. **J. Virol.**, v. 34, p. 665-674, 1980.
- STERN, D. F., BURGESS, L., SEFTON, B. M. Structural analysis of virion proteins of the avian coronavirus IBV. **J. Virol.**, v. 42, p. 208-219, 1982.
- STERN, D. F. & SEFTON, B. M. Coronavirus proteins: structure and function of the oligosaccharides of the avian infectious bronchitis virus glycoproteins. **J. Virol.**, v. 44, n. 3, p. 804-812, 1982 a.
- STERN, D. F. & SEFTON, B. M. Coronavirus proteins: biogenesis of avian infectious bronchitis virus virion proteins. **J. Virol.**, v. 44, n. 3, p. 794-803, 1982 b.
- STERN, D. F. & SEFTON, B. N. Coronavirus multiplication: locations of genes of virion proteins on the avian infectious bronchitis virus genome. **J. Virol.**, v.50, n.1, p.22-29,1984.
- STIRRUPS, K., SHAW, K., EVANS, S. et al. Rescue of IBV D-RNA by heterologous helper virus strains. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 440, p. 259-264, 1998.
- STOHLMAN, S. A., BARIC, R. S., NELSON, G. N. et al. Specific interaction between coronavirus leader RNA and nucleocapsid protein. **J. Virol.**, v. 62, n. 11, p. 4288-4295, 1988.
- STURMAN, L. S., HOLMES, K. V., BEHNKE, J. Isolation of coronavirus envelope glycoproteins and interaction with the viral nucleocapsid. **J. Virol.**, v. 33, n. 1, p. 449-462, 1980.
- SUTOU, S., SATO, S., OKABE, T. et al. Cloning and sequencing of genes encoding structural proteins of infectious bronchitis virus. **Virology**, v. 165, p. 589-595, 1988.

- UENAKA, T., KISHIMOTO, I., SATO, S. et al. Intracloacal infection with avian infectious bronchitis virus. *Avian Pathol.*, v. 27, p. 309-312, 1998.
- VILLEGAS, P. & AVELLANEDA, G. E. Interpretación de resultados serológicos en bronquitis infecciosa. *Avicultura Profes.*, v. 10, n. 1, p. 8-12, 1992.
- VILLEGAS, P. Doenças emergentes e de etiologia desconhecida. II Encontro Técnico Coopers para Avicultura, Coopers Brasil Ltda., p. 1-12, 1997.
- WANG, C. H. & TSAI, C. T. Genetic grouping for the isolates of avian infectious bronchitis virus in Taiwan. *Arch. Virol.*, v. 141, p. 1677-1688, 1996.
- WEIBLEN, R. Situação epidemiológica das principais enfermidades víricas no Conesul. In: Encontro Internacional de Virologia Molecular Veterinária. 1996, UFSM, *Anais RS*: 1996. p. 11-16.
- WENTZ, I. Bronquite infecciosa - que cepa vacinal usar?. In: Conferência APINCO 1988 de Ciência e Tecnologias Avícolas, 1988, Campinas, *Anais...* Campinas: 1988. p. 165-168.
- WHITEMAN, C. E. & BICKFORD, A.A. *Avian Diseases Manual*. 3 ed.. University of Pennsylvania, USA: The American Association of Avian Pathologists, 1989. cap. 40, p. 46-49.
- WILLIAMS, A. K., WANG, L., SNEED, L. W. et al. Comparative analyses of the nucleocapsid genes of several strains of infectious bronchitis virus and other coronavirus. *Virus Res.*, v. 25, n. 3, p. 213-222, 1992.
- WINTERFIELD, R. W. & HITCHNER, S. B. Etiology of an infectious nephritis-nephrosis of chickens. *Am. J. Vet. Res.*, v. 23, n. 93, p. 1273-1279, 1962.
- WIT, J. J., MEKKERS, D. R., KOUWENHOVEN, B. et al. Sensivity and specificity of serological tests for bronchitis virus antibodies in broilers. *Avian Pathol.*, v. 26, p. 105-118, 1997.
- WIT, J. J., JONG, M. C. M., PIJERS, A. et al. Transmission of infectious bronchitis virus within vaccinated and unvaccinated groups of chickens. *Avian Pathol.*, v. 27, p. 464-471, 1998.
- WITTER, R. T. The diagnosis of infectious bronchitis chickens by the agar gel precipitation test. *Avian Dis.*, v. 6, p. 478-492, 1962.
- WOLCOTT, M. J. Advances in nucleic acid-based detection methods. *Clin. Microbiol. Reviews*, v. 5, n. 4, p. 370-486, 1992.
- WU, Z. Q., YANG, Q. W., FU, C. et al. Antigenic and immunogenic characterization of infectious bronchitis strains isolated in China between 1986 and 1995. *Avian Pathol.*, v. 27, n. 6, p. 578-585, 1998.
- YOSHIDA, K. Programa de vacinação, monitoramento e perfil sorológico para poedeiras. In: Conferência APINCO 1991 de Ciência e Tecnologia Avícolas, 1991, Campinas, *Anais...* Campinas: 1991. p. 159-162.
- YOKOMORI, K., BANNER, L. R., LAI, M. M. C. Coronavirus mRNA transcription: UV light transcriptional mapping studies suggest an early requirement for genome-length template. *J. Virol.*, v. 66, p. 4671-4678, 1992.
- ZHAO, X., SHAW, K., CAVANAGH, D. et al. Presence of subgenomic mRNAs in virions of coronavirus IBV. *Virology*, v. 196, p. 172-178, 1993.
- ZHOU, M., WILLIAMS, A. K., CHUNG, S. I. et al. The infectious bronchitis virus nucleocapsid protein binds RNA sequences in the 3' terminus of the genome. *Virology*, v. 217, p. 191-199, 1996.
- ZWAAGSTRA, K.A, VANDER ZEIJST, B. A. M., KUSTERS, J. G. et al Rapid detection and identification of avian infectious

bronchitis virus. **J. Clin. Microbiol.** , v.
30, n. 1, p. 79-84, 1992.