

Salette Lobão Torres Santiago

T636.089 69

S235a

2001

**Análise Molecular de Isolados do Vírus da Bronquite Infecciosa das
Galinhas em Minas Gerais - Brasil**

Tese apresentada à Escola de Veterinária
da Universidade Federal de Minas Gerais,
como requisito parcial para obtenção do
grau de Doutor em Ciência Animal.
Área de concentração: Medicina
Veterinária Preventiva e Epidemiologia
Orientador: Prof. Dr. Nelson Rodrigo da
Silva Martins

Belo Horizonte
UFMG – Escola de Veterinária
2001

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA

01/09/02

448102-10

0328-76260

S235a
2001

Santiago, Salette Lobão Torres, 1962-

Análise molecular de isolados do vírus da bronquite infecciosa das galinhas em Minas Gerais – Brasil/Salette Lobão Torres Santiago. - Belo Horizonte: UFMG-Escola de Veterinária, 2001.

88p.: il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária

1. Galinha – Doenças – Teses. 2. Bronquite infecciosa em ave doméstica – Teses. I. Título.

CDD – 636.508 962 3

Tese defendida e aprovada no dia 27 de abril de 2001 pela Comissão Examinadora
constituída por:



Prof. Dr. Nelson Rodrigo da Silva Martins

(Orientador)

Profa. Dra. Zélia Inês Portela Lobato

Prof. Dr. Maurício Resende

Prof. Dr. Amauri Alcindo Alfieri

Prof. Dr. Edir Nepomuceno da Silva

Ao meu pai, Daltro (*in memoriam*), e minha mãe, Maria Dorcelina, a quem tudo devo: amor, carinho, dedicação e ensinamentos que nortearam minha vida. Aos meus irmãos, Sérgio, Marinêz e Marcelo, por estarem sempre presentes. Ao meu marido, Genário, pelo amor, incentivo e carinho e que, por isso, é tão especial nesta vitória. Aos meus filhos, Isadora e Vítor, grandes dádivas de Deus. Ao professor e amigo José Sérgio de Resende, grande responsável por esta realização.

Dedico este trabalho

AGRADECIMENTOS

A Deus, que sempre esteve presente em todos os momentos de minha vida.

Ao Professor Doutor Nelson Rodrigo da Silva Martins, pela orientação, apoio, amizade e ensinamentos.

Ao Professor José Sérgio de Resende, pela inestimável orientação, confiança e amizade.

Aos membros da comissão examinadora, Professor Doutor Nelson Rodrigo da Silva Martins, Professor Doutor Maurício Resende, Professora Doutora Zélia Inês Portela Lobato, Professor Doutor Amauri Alcindo Alfieri e Professor Doutor Edir Nepomuceno da Silva, pelas sugestões que enriqueceram este trabalho.

Ao Professor Doutor Maurício Resende, pelo apoio, amizade e eficientes colaborações, críticas e sugestões nas diversas etapas deste trabalho.

Aos professores da Escola de Veterinária da UFMG, em especial aos Professores Doutores Andrey Pereira Lage, Maurílio Andrade Rocha e Zélia Inês Portela Lobato, pela atenção, disponibilidade e amizade.

À Professora Doutora Edel Figueiredo Barbosa Stancioli, pelas orientações recebidas, amizade e estímulo.

Ao Professor Doutor Evanguedes Kalapothakis, pela cordialidade com que sempre me recebeu.

À Professora Doutora Ana Paula Salles Moura Fernandes, pelo apoio, incentivo e valiosas contribuições na análise das seqüências de DNA.

Aos pesquisadores Doutor Roberto Becht Flatschart e Doutora Áurea Valadares Folgueras Flatschart, pelas contribuições prestadas no decorrer deste trabalho.

A John Lester, pela realização dos seqüenciamentos de DNA.

Ao pesquisador Max Augusto Jorge, pela amizade e momentos de descontração.

Aos colegas e amigos da Pós-graduação, pela agradável convivência.

A Marcos Cláudio Pinheiro Rogério, pelo carinho, amizade e auxílio no preparo da apresentação deste trabalho.

À colega de orientação, Josiane Tavares de Abreu, pelos bons momentos de convivência.

Aos colegas, Marcelo Camargos e Luciana Inácia Gomes, pela prestabilidade e atenção.

Aos técnicos Cláudio Rocha Públio e Ismael Faustino de Souza, pelo carinho, amizade e boa vontade.

À equipe do Laboratório de Virologia Comparada do Instituto de Ciências Biológicas/UFMG e, em especial, a Betânia Paiva Drumond, que sempre esteve pronta a colaborar.

A Juliana Alves da Silva, pela cordialidade e valiosa colaboração no preparo dos géis de poliacrilamida.

A Nádia Maria da Silva, pela amizade, apoio e inesgotável paciência.

À Universidade Estadual do Ceará – UECE e à Faculdade de Veterinária por haver possibilitado meu afastamento para a realização do curso.

À Escola de Veterinária da UFMG pela oportunidade de realização deste curso.

Ao colegiado de Pós-Graduação representado pelo coordenador Professor Doutor Rômulo Cerqueira Leite e pelas funcionárias Nilda Lucas Laurindo, Fátima Regina Peixoto, Eliana Silva e Flávia Aline Guimarães Silva, pela atenção e boa vontade.

À CAPES pela bolsa de estudo concedida.

Obrigada aos profissionais e amigos que me alentaram neste trabalho e colaboraram comigo.

“Jamaís poderemos compreender o que o outro espera de nós e o que esperamos do outro. Mas ainda é preferível fazer, mesmo errando, a nada fazer pelo medo de errar”.

(Anônimo)

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	9
LISTA DE FIGURAS.....	9
LISTA DE ABREVIATURAS.....	10
RESUMO.....	12
ABSTRACT.....	12
1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1 Taxonomia e Características Essenciais da Família <i>Coronaviridae</i>	15
2.2 Estrutura do Vírus da Bronquite Infecciosa das Galinhas (VBIG).....	16
2.2.1 Morfologia do vírion.....	16
2.2.2 Proteínas estruturais.....	18
2.2.2.1 Glicoproteína S.....	18
2.2.3 RNA genômico.....	19
2.3 Replicação do VBIG.....	20
2.4 Heterogeneidade Genética do VBIG.....	22
2.5 A Doença.....	24
2.6 Histórico.....	25
2.7 Situação no Brasil.....	26
2.8 Importância Econômica.....	26
2.9 Diagnóstico.....	27
2.9.1 Reação em cadeia pela polimerase – PCR.....	28
2.10 Métodos de Classificação do VBIG.....	30
2.10.1 Polimorfismo nos comprimentos dos fragmentos obtidos com o uso de enzimas de restrição (RFLP).....	32
2.11 Seqüenciamento de DNA.....	34
2.12 Controle.....	35
3 ESTUDOS EXPERIMENTAIS.....	37
3.1 Detecção de Isolados do Vírus da Bronquite Infecciosa das Galinhas Utilizando a Transcrição Reversa – Reação em Cadeia pela Polimerase (RT-PCR) do Gene Codificador da Glicoproteína S1.....	37
3.1.1 Introdução.....	37
3.1.2 Material e métodos.....	37
3.1.3 Resultados e discussão.....	48
3.2 Classificação de Isolados do Vírus da Bronquite Infecciosa das Galinhas Pela Análise do Polimorfismo nos Comprimentos dos Fragmentos de Restrição (RFLP) do Gene Codificador da Glicoproteína S1.....	52
3.2.1 Introdução.....	52
3.2.2 Material e métodos.....	54
3.2.3 Resultados e discussão.....	56
3.3 Seqüenciamento Parcial do Gene S1 de Isolados do Vírus da Bronquite Infecciosa das Galinhas (VBIG) no Estado de Minas Gerais – Brasil.....	65
3.3.1 Introdução.....	65
3.3.2 Material e métodos.....	66
3.3.3 Resultados e discussão.....	68
4 CONCLUSÕES.....	74
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Espécies dentro dos gêneros <i>Coronavirus</i> e <i>Torovirus</i> de <i>Coronaviridae</i>	15
Tabela 2 – Amostras de referência do vírus da bronquite infecciosa das galinhas (VBIG).....	38
Tabela 3 – Isolados do vírus da bronquite infecciosa das galinhas (VBIG) provenientes de surtos da doença na avicultura industrial no Estado de Minas Gerais, no período compreendido entre 1972 e 1989.....	39
Tabela 4 – Oligonucleotídeos utilizados na amplificação do gene codificador da glicoproteína S1 do vírus da bronquite infecciosa das galinhas (VBIG).....	41
Tabela 5 – Características dos oligonucleotídeos.....	43
Tabela 6 – Concentrações finais dos reagentes utilizados nas reações em cadeia pela polimerase (PCR).....	45
Tabela 7 – Programas de amplificação utilizados nas reações em cadeia pela polimerase do gene codificador da glicoproteína S1.....	46
Tabela 8 – Composições dos tampões de reação das enzimas de restrição.....	55
Tabela 9 – Concentrações inicial e final dos reagentes utilizados nas reações de digestão enzimática.....	55
Tabela 10 – Tamanhos dos fragmentos (pb) das amostras de referência do vírus da bronquite infecciosa das galinhas (VBIG) com seqüências depositadas no <i>GenBank</i> obtidos pelas enzimas de restrição.....	60

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática do genoma do vírus da bronquite infecciosa das galinhas (VBIG) e sua relação com os principais componentes estruturais.....	17
Figura 2 – Organização e expressão do genoma do vírus da bronquite infecciosa das galinhas (VBIG) e seus RNAs mensageiros (mRNAs) subgenômicos.	20
Figura 3 – Ciclo de replicação do vírus da bronquite infecciosa das galinhas (VBIG).....	21
Figura 4 – Posição de anelamento dos oligonucleotídeos no genoma do vírus da bronquite infecciosa das galinhas (VBIG).....	42
Figura 5 – Fluxograma representativo da transcrição reversa (RT).....	44
Figura 6 – Produtos de RT-PCR em gel de agarose 1% corado por brometo de etídio.	49
Figura 7 – Perfil de restrição enzimática em gel de agarose 2% (corado por brometo de etídio) dos produtos amplificados (gene S1 do VBIG das amostras de referência e dos isolados virais) por RT-PCR e digeridos com <i>Bst</i> YI.....	57
Figura 8 – Perfil de restrição enzimática em gel de agarose 2% (corado por brometo de etídio) dos produtos amplificados (gene S1 do VBIG das amostras de referência e dos isolados virais) por RT-PCR e digeridos com <i>Hae</i> III.....	58
Figura 9 – Perfil de restrição enzimática em gel de agarose 2% (corado por brometo de etídio) dos produtos amplificados (gene S1 do VBIG das amostras de referência e dos isolados virais) por RT-PCR e digeridos com <i>Xcm</i> I.....	59

Figura 10 – Mapas de restrição do gene amplificado (S1) das amostras de referência (M41, SE-17, JMK, 6/82, ARK-99) digerido com as enzimas <i>Bst</i> YI, <i>Hae</i> III e <i>Xcm</i> I.....	61
Figura 11 – Fenograma construído pelo <i>software</i> NTSYS a partir dos resultados da digestão enzimática de nove amostras de referência e de 14 isolados do vírus da bronquite infecciosa das galinhas (VBIG) provenientes do estado de Minas Gerais com as enzimas de restrição <i>Bst</i> YI, <i>Hae</i> III e <i>Xcm</i> I.....	62
Figura 12 – Árvore filogenética construída pelo programa <i>Treecon</i> , a partir do alinhamento das seqüências nucleotídicas (862 nt) obtidas do gene codificador da glicoproteína S1 dos isolados do vírus da bronquite infecciosa das galinhas (VBIG) utilizados neste estudo.....	69
Figura 13 – Árvore filogenética construída pelo programa <i>Treecon</i> , a partir do alinhamento das seqüências nucleotídicas da região hipervariável 1 (HVR1), do gene codificador da glicoproteína S1 dos isolados do vírus da bronquite infecciosa das galinhas (VBIG) utilizados neste estudo.	70
Figura 14 – Árvore filogenética construída pelo programa <i>Treecon</i> , a partir do agrupamento das seqüências nucleotídicas da região hipervariável 1 (HVR 1) do gene codificador da glicoproteína S1 dos 12 isolados do vírus da bronquite infecciosa das galinhas (VBIG) e das amostras de referência utilizadas neste estudo com seqüências depositadas no <i>GenBank</i>	72

LISTA DE ABREVIATURAS

AGP	Imunodifusão em ágar gel
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BIG	Bronquite infecciosa das galinhas
BSA	Albumina bovina sérica
cDNA	DNA complementar
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Deoxinucleotídeo
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
EtBr	Brometo de etídio
FACTA	Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas
H	Horas
Hai	Horas após a inoculação
HVR	Região hipervariável
IH	Inibição da hemaglutinação
Kb	Quilobases ou 10 ³ pb
kDa	Quilodalton
LA	Líquido alantoidiano
M	Molar
Mabs	Anticorpos monoclonais
min	Minutos
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MmuLV	Vírus “Moloney” da leucemia murina
mRNA	RNA mensageiro
nm	Nanômetros
nt	Nucleotídeo
OEG	Ovos embrionados de galinhas
ORF	<i>Opening Reading Frame</i> – Janela aberta de leitura

OTU	Unidades taxonômicas operacionais
pb	Pares de bases
PBS	Solução salina tamponada contendo fosfato
PCR	Reação em cadeia pela polimerase
p/v	Peso por volume
RFLP	Polimorfismo nos comprimentos dos fragmentos obtidos com o uso de enzimas de restrição
RNA	Ácido ribonucleico
RT	Transcrição reversa
RT-PCR	Transcrição reversa associada à reação em cadeia pela polimerase
RVC	<i>Ribonucleoside Vanadyl Complexes</i>
s	Segundos
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SPF	Livre de patógenos específicos
TA	Temperatura ambiente
TAE	Tris-acetato-EDTA
TBE	Tris-borato-EDTA
TE	Tris-EDTA
U	Unidades de enzima
UPGMA	Método da média aritmética não ponderada
UTR	Região não traduzida
UV	Ultravioleta
V	Volts
VBIG	Vírus da bronquite infecciosa das galinhas
VDN	Vírus da doença de Newcastle
μL	Microlitros

RESUMO

Reação em cadeia pela polimerase (PCR), análise do polimorfismo nos comprimentos dos fragmentos obtidos com o uso de enzimas de restrição (RFLP) e seqüenciamento direto foram utilizados para diferenciar isolados do vírus da bronquite infecciosa das galinhas (VBIG) provenientes de algumas regiões do Estado de Minas Gerais, Brasil, no período compreendido entre 1972 e 1989. Nove amostras de referência do VBIG, compreendendo oito diferentes sorotipos, e 15 isolados provenientes de surtos da doença em plantéis vacinados e não vacinados foram estudados. Uma seqüência de aproximadamente 1720 pares de bases que contém o gene da glicoproteína S1 do VBIG foi amplificada por PCR e os produtos purificados e digeridos com três enzimas de restrição, *Bst*YI, *Hae*III e *Xcm*I. Os diferentes isolados e amostras do VBIG foram agrupados de acordo com os seus padrões de RFLP. Os resultados indicaram perfis de restrição diferentes entre algumas amostras de referência e os isolados virais estudados. Dos 14 isolados de VBIG, três (21,43%) foram semelhantes às amostras pertencentes ao sorotipo Massachusetts. A maioria dos isolados (78,57%) não apresentou semelhança com as amostras de referência estudadas, incluindo a amostra vacinal, o que sugere que eles não são derivados de vacinas vivas atenuadas e podem, portanto, ser considerados como variantes. Entretanto, como mesmo estirpes vacinais estão sujeitas à recombinação e mutação genética e, podem ser disseminadas com certa facilidade entre plantéis, esta possibilidade persiste. Os resultados obtidos pelo seqüenciamento direto dos isolados de VBIG foram semelhantes aos obtidos por RFLP, sendo que a caracterização das amostras brasileiras resultou na identificação de amostras variantes.

Palavras-chave: RT-PCR/RFLP, bronquite infecciosa das galinhas, glicoproteína S, doenças das aves, caracterização molecular.

ABSTRACT

*In order to differentiate isolates of avian infectious bronchitis virus (IBV) in Minas Gerais state, Brasil, during period from 1972 to 1989, polymerase chain reaction (PCR), restriction fragment length polymorphism (RFLP) and direct sequencing methods were used. Nine reference IBV strains (eight serotypes) and 15 field isolates were studied. A sequence of about 1720 base pairs (bp) that contains the S1 glycoprotein gene of IBV was amplified by PCR. PCR products were purified and digested with three restriction endonucleases, *Bst*YI, *Hae*III and *Xcm*I and the IBV isolates and strains could be placed into groups according to their RFLP patterns. The results indicated different restriction profiles between some reference strains and the isolates studied. Among the 14 IBV isolates, three (21.43%) were similar to the strains of Massachusetts serotype. Most of the IBV isolates (11/14) revealed not to be related to the reference strains studied, including the vacinal strains, suggesting that they are not live attenuated vaccines derivatives and can, therefore, be considered as variants. The phylogenetic classification obtained by direct sequencing of the Brazilian IBV isolates was similar to that obtained for RFLP and resulted in identification of variants.*

Keywords: RT-PCR/RFLP, avian diseases, infectious bronchitis virus, molecular characterization, gene S1.

1 INTRODUÇÃO

A avicultura é a atividade agropecuária que mais evoluiu nas últimas décadas. Essa evolução foi devida à melhoria constante de fatores como genética, nutrição, técnicas de manejo, instalações e sanidade, entre outros. O Brasil, em 1999, produziu 5,14 milhões de toneladas de frangos, exportando 770 mil toneladas, gerando receita de US\$ 875 milhões (EMBRAPA, 2000). Com esse desempenho, em 1999, o país foi o segundo maior exportador mundial de frangos e o consumo interno *per capita* ficou em 26,5 kg/habitante/ano. Segundo dados da FACTA (1995), a avicultura participa com mais de 2,5% do produto interno bruto (PIB) nacional.

Apesar de todos os recursos técnico-científicos desenvolvidos pelos maiores e mais importantes centros de pesquisas avícolas nacionais e internacionais, e da avançada tecnologia com que se desenvolve a avicultura, ainda permanece o problema do controle de algumas enfermidades aviárias, cujos danos reduzem lucros e geram riscos, às vezes, com grandes prejuízos econômicos às atividades avícolas.

A indústria de apoio, envolvida na produção de insumos biológicos destinados à avicultura industrial, tem cumprido sua função, de forma satisfatória, no tocante às vacinas convencionais destinadas à prevenção e ao controle das viroses aviárias. Entretanto, são necessárias pesquisas envolvendo estas amostras vacinais visando sua implementação ou substituição por amostras mais adequadas, já que, em vários casos, sua introdução foi emergencial e sem adequado e desejado estudo prévio de eficiência.

A bronquite infecciosa das galinhas (BIG) continua sendo problema freqüente em frangos de corte, reprodutoras e poedeiras, nos quais se tem verificado ocorrência, mesmo em aves vacinadas. Embora seja doença antiga, a BIG ainda provoca grandes perdas econômicas à indústria avícola em todo o mundo, apesar do uso rotineiro de vacinas comercialmente disponíveis.

Aspecto importante do vírus da bronquite infecciosa das galinhas (VBIG), em virtude da estrutura organizacional do seu genoma e do seu tamanho, é a variabilidade genética, particularmente no gene que codifica a glicoproteína de superfície (S1). A biologia molecular tem sido cada vez mais explorada no estudo da variabilidade genética entre os vírus. Estudos foram desenvolvidos para o coronavírus em que foram evidenciados vários mecanismos (mutações de ponto, inserções, deleções e recombinações) responsáveis pela sua heterogeneidade genética.

Os recentes progressos na biologia molecular e no processamento informatizado de dados têm conduzido ao aperfeiçoamento dos conhecimentos sobre a biologia dos vírus e ao desenvolvimento de técnicas adaptáveis para o diagnóstico e para os estudos epidemiológicos. Os principais exemplos da aplicação da biologia molecular na prática veterinária são o diagnóstico pela amplificação de ácidos nucleicos usando a reação em cadeia pela polimerase (PCR) e os estudos filogenéticos, baseados em seqüências de genes virais.

O desenvolvimento de técnicas crescentemente sofisticadas nos capacita a definir sorotipos de VBIG mais facilmente e com maior exatidão. A introdução de técnicas está aumentando a compreensão da estrutura molecular e função dos diferentes componentes de VBIG.

Técnicas de PCR, polimorfismo nos comprimentos dos fragmentos obtidos com o uso de enzimas de restrição (RFLP) e seqüenciamento de DNA poderão fornecer importantes dados sobre o polimorfismo genético entre amostras do VBIG com a possibilidade de se detectar estreita relação entre eles, identificando semelhanças e divergências entre seus genomas, contribuindo no controle da BIG, explicando o endemismo de algumas amostras em determinadas regiões e a evolução e disseminação por todo o mundo.

O gene codificador da proteína S1 do VBIg foi escolhido, neste estudo, devido ao importante papel desta proteína na indução de anticorpos virus-neutralizantes (IGNJATOVIC & MCWATERS, 1991), na imunidade protetora (IGNJATOVIC & GALLI, 1994) e por ser o mais variável dos genes (WANG *et al.*, 1994).

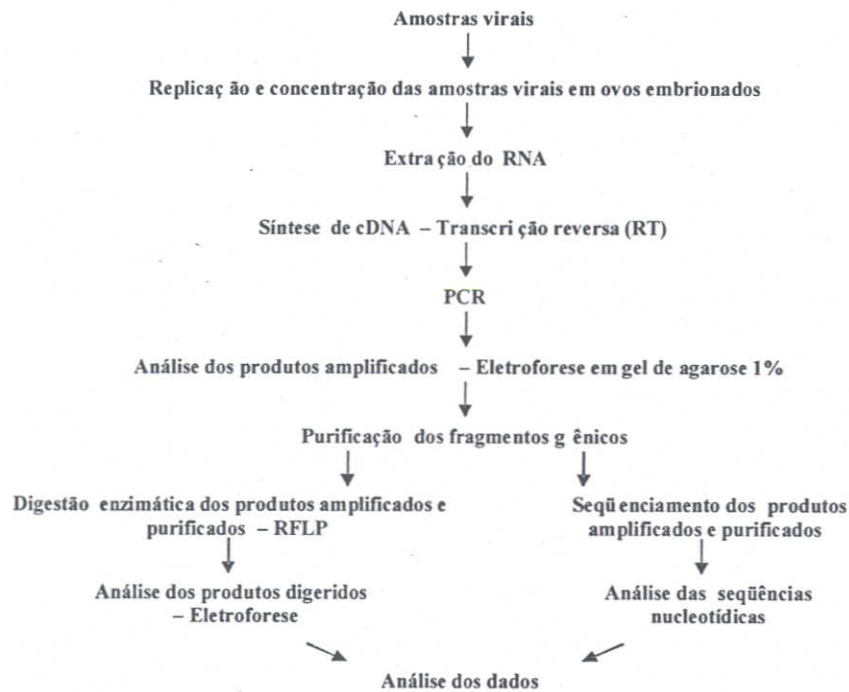
Este trabalho teve como objetivo geral verificar a ocorrência de variabilidade genética entre isolados do VBIg provenientes de algumas regiões do estado de Minas Gerais, Brasil, no período compreendido entre 1972 e 1989 e como objetivos específicos:

- amplificar, utilizando a RT-PCR, o gene codificador da glicoproteína S1 de alguns isolados do VBIg oriundos de diferentes regiões de Minas Gerais, Brasil;
- caracterizar a presença de polimorfismo entre os isolados de VBIg oriundos de

diferentes regiões de Minas Gerais, utilizando a técnica de RT-PCR/RFLP;

- relacionar o polimorfismo genético encontrado entre as amostras em estudo com o ano de isolamento, tipo de ave do qual foram isoladas e o quadro clínico apresentado pelas mesmas;
- analisar os dados gerados pela construção de fenograma para elucidar as posições taxonômicas destas amostras e inferir sobre as suas relações filogenéticas;
- estabelecer a similaridade nas seqüências nucleotídicas entre os isolados de VBIg, com base nas seqüências da HVR 1 do gene S1, comparando às seqüências gênicas de amostras de referência depositadas em banco de dados (*GenBank*).

Estratégia Geral do Trabalho



2 REVISÃO DE LITERATURA

A palavra “grande” é, talvez, das primeiras que vêm à mente quando se considera o genoma do *Coronavirus*. A natureza do genoma do *Coronavirus* – não segmentado, fita simples, RNA de polaridade positiva – não é fora do comum, mas o seu tamanho, 27 a 32 quilobases (Kb), certamente é, quando comparado a outros vírus RNA (LAI & CAVANAGH, 1997).

O *Coronavirus* é responsável por grande número de doenças economicamente importantes. Foram reconhecidos como grupo em 1968 e subsequentemente inseridos em família distinta. O VBIG foi o primeiro *Coronavirus* a ser isolado e propagado na década de 30 do século passado. Além da doença respiratória, que pode predispor as galinhas a infecções bacterianas secundárias (possivelmente letais) e salpingite, algumas amostras também causam nefrite (KING & CAVANAGH, 1991).

2.1 Taxonomia e Características Essenciais da Família *Coronaviridae*

Todo *Coronavirus* pertence ao gênero *Coronavirus*, da família *Coronaviridae*. Estes vírus são de grande interesse devido às diversas doenças causadas por membros desta família e ao modo característico de expressão gênica (STERN *et al.*, 1982).

Inicialmente, análises sorológicas foram usadas para diferenciar espécies de *coronavirus* e mostraram que eles poderiam ser divididos em quatro grupos antigênicos (HOLMES, 1990).

As divisões de espécies e grupos foram posteriormente refinadas em análises por anticorpos monoclonais e seqüenciamento de nucleotídeos, revelando a estreita relação entre *coronavirus* de perus (TCV) e *coronavirus* bovino (BCV), resultando na atual classificação de três grupos antigênicos (Tabela 1).

Tabela 1 – Espécies dentro dos gêneros *Coronavirus* e *Torovirus* de *Coronaviridae*

	Espécies	Grupo antigênico	Presença do gene HE
<i>Coronavirus</i>			
VBIG	Vírus da bronquite infecciosa das galinhas	3	-
MHV	Vírus da hepatite murina	2	+
BCV	<i>Coronavirus</i> bovino	2	+
HCV (OC43)	<i>Coronavirus</i> humano OC43	2	+
HEV	Vírus da encefalomielite hemaglutinante suína	2	+
TCV	<i>Coronavirus</i> de perus	2	+
TGEV	Vírus da gastroenterite transmissível suína	1	-
FCV	<i>Coronavirus</i> felino e vírus da peritonite infecciosa felina (FIPV)	1	-
CCV	<i>Coronavirus</i> canino	1	-
HCV (229E)	<i>Coronavirus</i> humano 229E	1	-
PEDV	Vírus da diarreia epidêmica dos suínos	1	-
<i>Torovirus</i>			
BEV	Berne vírus (eqüino)		+
BRV	Breda vírus (bovino)		NC

NC – Não conhecido

Fonte: LAI & CAVANAGH (1997)

Análises antigênicas e genômicas mais recentes do TCV têm questionado estes agrupamentos taxonômicos, particularmente a classificação do TCV (GUY *et al.*, 1997; BRESLIN *et al.*, 1999).

Análises antigênicas realizadas por GUY *et al.* (1997) demonstraram estreita relação entre TCV e VBI; estes estudos falharam em detectar relação antigênica entre TCV e o grupo 2 de *Coronavirus*. Evidência adicional de relação entre TCV e VBI tem sido mostrada a partir de análises de seqüências de genes das proteínas estruturais e do gene da polimerase. Estes estudos têm sido conduzidos em dois laboratórios independentes (BRESLIN *et al.*, 1999; STEPHENSEN *et al.*, 1999). Análises filogenéticas realizadas por BRESLIN *et al.* (1999) e STEPHENSEN *et al.* (1999) forneceram evidências de estreita relação genética entre TCV e VBI. No entanto, estudos adicionais de seqüenciamento envolvendo outras amostras de TCV e outras regiões do genoma, particularmente do gene S, são necessários para verificar a relação taxonômica entre TCV e VBI. GUY (2000) considera o VBI e o TCV espécies de vírus distintas, que compartilham estreita relação filogenética e juntos compreendem o grupo antigênico 3 dos coronavírus.

A família *Coronaviridae* permaneceu monogenérica por um quarto de século, até que o acúmulo de observações mostrou que muitas das características pertencentes à família *Coronaviridae* eram bem aplicadas ao gênero *Torovirus* que não tinha sido oficialmente nomeado como sendo da família. Por esta razão, em 1993, o Comitê Internacional para Taxonomia de Virus (ICTV) expandiu formalmente a família *Coronaviridae* para a inclusão do gênero *Torovirus*.

A família *Coronaviridae* pertence à ordem *Nidovirales*, composta por vírus contendo genomas RNA fita simples, de polaridade positiva, linear, não segmentado, com organização genômica semelhante e grupos de RNAs mensageiros (mRNAs) subgenômicos (CAVANAGH *et al.*, 1997). O genoma do *Coronavirus* é uma molécula de RNA com tamanho variando entre 28 e 32 Kb (LAI & CAVANAGH, 1997). Os vírions são envelopados, pleomórficos, com 80 a 220 nm de diâmetro, possuindo projeções superficiais de aproximadamente 20 nm de comprimento. Quatro proteínas estruturais são conhecidas: a glicoproteína da espícula (S) (90 a 180 kDa), a proteína integral da membrana (M) (20 a 35 kDa), a pequena proteína do envelope (E) (12,5 kDa) e a proteína do nucleocapsídeo (50 a 60 kDa) (LAI & CAVANAGH, 1997). Além disso, há *Coronavirus* que contêm a quinta proteína estrutural, a hemaglutinina esterase (120 a 140 kDa) (HOLMES & LAI, 1996).

2.2 Estrutura do Vírus da Bronquite Infecciosa das Galinhas (VBI)

2.2.1 Morfologia do vírion

O VBI é o protótipo da família *Coronaviridae* (SIDDELL *et al.*, 1983). É vírus envelopado, pleomórfico, geralmente arredondado, com diâmetro variando entre 90 a 200 nm (DAVIES & MACNAUGHTON, 1979). As projeções superficiais em forma de pétalas que rodeiam o vírion (20 nm) conferem a ele aspecto de coroa solar, daí a denominação coroa (LAI & CAVANAGH, 1997). A representação esquemática do genoma do VBI pode ser vista na Figura 1.

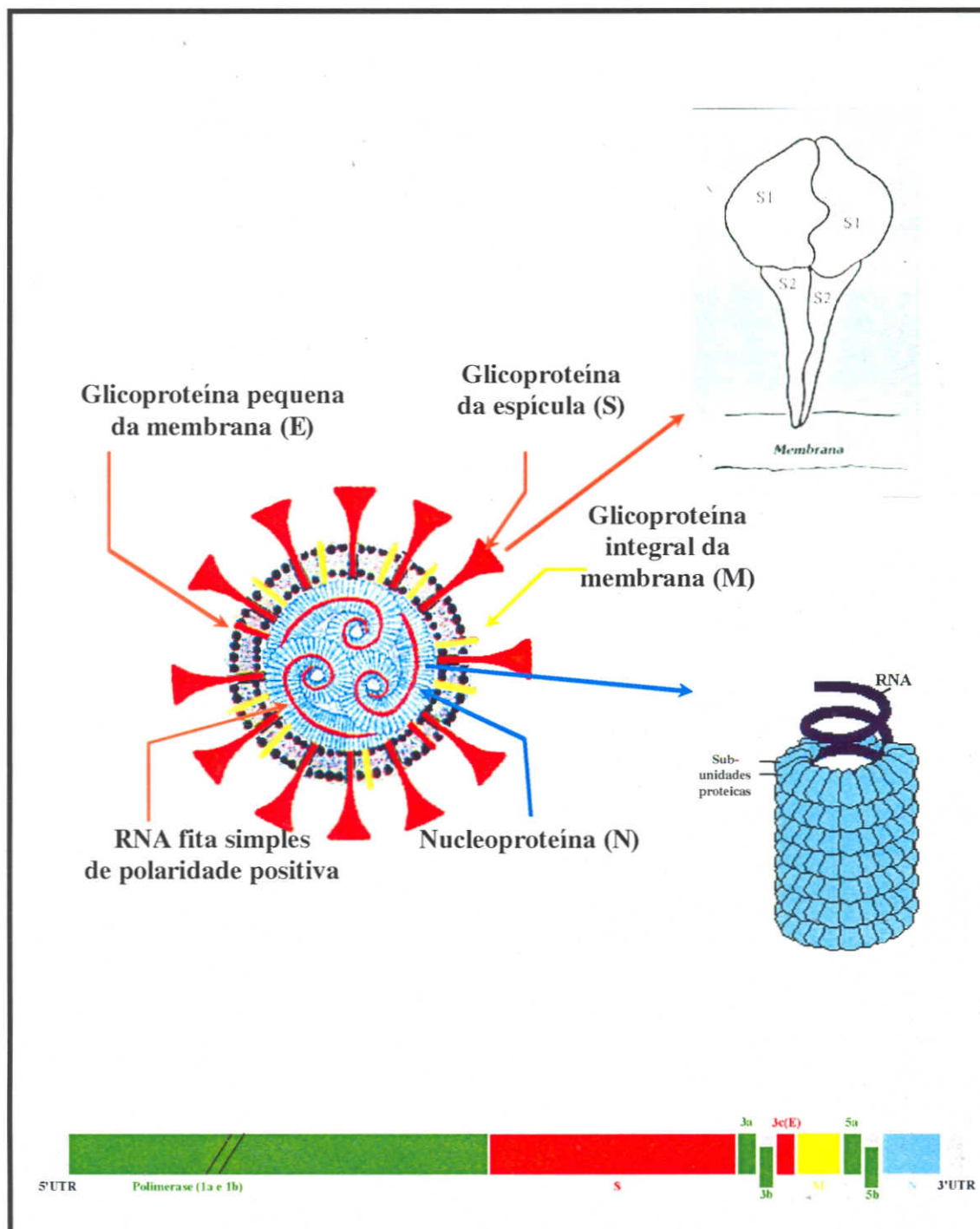


Figura 1 - Representação esquemática do genoma do vírus da bronquite infecciosa das galinhas (VBIG) e sua relação com os principais componentes estruturais. Figura modificada de CARGILL (1998). O desenho da glicoproteína da espícula (S) foi retirado de AVELLANEDA (1992).

2.2.2 Proteínas estruturais

A clonagem e seqüenciamento do RNA dos *Coronavirus* têm aumentado o conhecimento sobre as proteínas virais estruturais e não estruturais. As proteínas estruturais do VBIG são a nucleoproteína fosforilada (56 kDa), a proteína da membrana, que é heterogeneamente glicosilada (23 a 36 kDa), as glicoproteínas S1 e S2 (92 e 84 kDa, respectivamente) (CAVANAGH, 1981; STERN & SEFTON, 1982; STERN *et al.*, 1982), além da pequena proteína da membrana (E). As espículas ou peplômeros do VBIG são formadas por duas ou três cópias cada de S1 e S2 (CAVANAGH, 1983). A subunidade S2 é ancorada na membrana viral por pequeno segmento transmembrânico hidrofóbico e forma o suporte do peplômero, onde a subunidade S1, a qual não é covalentemente associada a S2, forma o bulbo (CAVANAGH, 1983; DEGROOT *et al.*, 1987).

A proteína do nucleocapsídeo (N) é fortemente associada ao RNA genômico - formando a ribonucleoproteína - e possui seqüências nucleotídicas e de aminoácidos altamente conservadas, ou seja, muito pouca variação na seqüência do gene N é observada entre várias amostras do VBIG (HANDBERG *et al.*, 1999). Esta característica facilita o estudo de similaridade de amostras pertencentes a sorotipos muito distintos, permitindo a formação de grandes grupos. A proteína N, fosforilada e não glicosilada, possui variadas funções, além de servir como componente estrutural do nucleocapsídeo helicoidal (STURMAN & HOLMES, 1983). Ela exerce importante papel na patogênese e replicação virais e é prontamente indutora de anticorpos, assim como da imunidade celular mediada por linfócitos T citotóxicos em galinhas (SNEED *et al.*, 1989; WILLIAMS *et al.*, 1992; SEO *et al.*, 1997).

A proteína M do VBIG difere das proteínas de membrana de muitos vírus por ser glicosilada. A variação no grau de glicosilação é responsável pela heterogeneidade do peso molecular (STERN & SEFTON, 1982; STERN *et al.*, 1982). Esta é uma das duas proteínas estruturais que são essenciais para a produção de partículas virais. A seqüência da proteína M revela constituição compreendendo 225 a 230 aminoácidos, em torno de 20 expostos na superfície viral e

correspondendo aos principais sítios antigênicos da proteína (ROTTIER *et al.*, 1986).

Acreditava-se que o VBIG possuísse somente três proteínas estruturais (S, N e M). Agora está perfeitamente claro que possui uma proteína adicional, a pequena proteína da membrana (E) (SMITH *et al.*, 1990; LIU *et al.*, 1991). Ela exerce importante papel na montagem do vírion. Tem sido mostrado que esta proteína, juntamente à proteína M, são as duas proteínas virais requeridas para a montagem do vírion (BOS *et al.*, 1996). A proteína E está localizada na região perinuclear, com alguma migração para a superfície celular (YU *et al.*, 1994). Evidência experimental sugere que a proteína E está ancorada na membrana pela metade N-terminal da molécula.

2.2.2.1 Glicoproteína S

A glicoproteína S é o componente mais externo do vírion e é responsável pela adsorção do vírus nas células (COLLINS *et al.*, 1982; KUBO *et al.*, 1994). O gene codificador da glicoproteína S do VBIG possui 3,5 Kb de comprimento e localiza-se adjacente ao gene da polimerase. A glicoproteína S é de particular importância no processo infeccioso porque: (a) possui atividade de fusão (DEGROOT *et al.*, 1989) e (b) contém sítios contra os quais anticorpos neutralizantes são dirigidos (IGNJATOVIC & GALLI, 1994).

É o alvo primário para respostas imunes do hospedeiro, considerando que os anticorpos neutralizantes são induzidos principalmente pela S (COLLINS *et al.*, 1982). A proteína da espícula, que está envolvida com neutralização viral, especificidade de sorotipos e adsorção celular, é clivada pós-tradução em S1 N-terminal e S2 C-terminal, com pesos moleculares de 90.000 e 84.000, respectivamente (STERN & SEFTON, 1982). A clivagem proteolítica é requerida para a infectividade viral (KEELER Jr. *et al.*, 1998). A subunidade N-terminal (S1), de estrutura globular, é responsável pela adsorção (CAVANAGH & DAVIS, 1986) e indução de anticorpos vírus neutralizantes (CAVANAGH *et al.*, 1988). A subunidade C-terminal (S2) ancora a S1 no envelope viral. A variação na seqüência é, geralmente, exibida mais pela S que por qualquer outra proteína estrutural; a variação na seqüência da proteína S provavelmente confere

vantagem seletiva em animais imunes. O polipeptídeo S2 é muito mais conservado que S1 que demonstra mais variabilidade na seqüência (KUSTERS *et al.*, 1989). Além disso, comparações nas seqüências de S1 entre diferentes amostras do VBIg têm revelado regiões hipervariáveis, incluindo freqüentes deleções, mutações ou recombinação (CAVANAGH *et al.*, 1988; KUSTERS *et al.*, 1989) e sugerindo que estas regiões são externamente expostas e não essenciais à estrutura e replicação.

A subunidade S1 possui 1605-1632 nucleotídeos de comprimento e codifica uma proteína estrutural de 520 aminoácidos. Existem duas regiões hipervariáveis (HVR) na subunidade S1 que compreendem resíduos de 56-69 e 117-133 (NIESTERS *et al.*, 1986). Acredita-se que os resíduos dentro da HVR 1 estejam associados com epitópos indutores de anticorpos neutralizantes (LENSTRA *et al.*, 1989; Ignjatovic & GALLI, 1994) e variação nesta região correlaciona com sorotipo (CAVANAGH *et al.*, 1988; WANG & HUANG, 2000). O comprimento da parte S1 do genoma varia entre isolados do VBIg (ADZHAR *et al.*, 1996).

A S1 é a principal responsável pela diversidade antigênica entre as amostras do VBIg e importante indutora de anticorpos neutralizantes relacionados à proteção vacinal. Por este motivo, esta região é utilizada como alvo nos ensaios de sorotipagem por vírus neutralização e na tipagem molecular (KWON *et al.*, 1993; JACKWOOD *et al.*, 1997).

Devido ao fato dos epitópos vírus neutralizantes estarem associados à subunidade S1, este tem sido mais extensivamente estudado que qualquer outro componente gênico do VBIg (KOCH *et al.*, 1990). Entretanto, tem sido demonstrado também que a subunidade S2 pode induzir anticorpos neutralizantes e sorotipos do VBIg podem ser agrupados baseados na seqüência do gene S2 (KUSTERS *et al.*, 1989). A seqüência do gene S2 é mais conservada que a do gene S1, mostrando, assim mesmo, variabilidade de seqüência entre diferentes sorotipos do VBIg (KUSTERS *et al.*, 1989; LIN *et al.*, 1991; CALLISSON *et al.*, 1999).

As seqüências do gene S1 mostram alto grau de variabilidade entre diferentes sorotipos, porém são relativamente conservadas entre as amostras

do VBIg do mesmo sorotipo (KUSTERS *et al.*, 1989).

Não há evidências indicando que a proteína S do VBIg determine o nefrotropismo de amostras tais como a belga B1648 e dos isolados norte-americanos Gray e Holte (ALBASSAM *et al.*, 1986). Entretanto, acredita-se que diferenças nas proteínas S de amostras de coronavírus do vírus da hepatite murina estejam associadas ao tropismo tecidual (CAVANAGH, 1995).

Ensaio com ELISA (*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*) competitivo com diferentes anticorpos neutralizantes revelaram cinco sítios antigênicos indutores de anticorpos, todos na subunidade S1 (KOCH *et al.*, 1990). O extensivo seqüenciamento do gene S de mutantes resistentes a anticorpos monoclonais revelou que estes sítios estão localizados principalmente nas regiões hipervariáveis (CAVANAGH *et al.*, 1992).

Novos sorotipos do VBIg antigenicamente diferentes são facilmente criados na natureza, resultantes de pequenas mudanças de aminoácidos na proteína S (CAVANAGH *et al.*, 1992; KANT *et al.*, 1992).

2.2.3 RNA genômico

O VBIg possui genoma RNA fita simples, polaridade positiva, não segmentado. A seqüência completa do RNA viral da amostra Beaudette mostra que seu tamanho é de 27,6 Kb, excluindo a cauda de poli A (BOURSNELL *et al.*, 1987). O RNA viral funciona como mRNA para a tradução de proteínas (SPAAN *et al.*, 1988) e é infeccioso. Os genes estão dispostos na ordem 5' - Polimerase - S - sM - M - N - 3' (BOURSNELL *et al.*, 1987; HOLMES & LAI, 1996). O gene 1 (gene da RNA polimerase) está localizado na terminação 5' do genoma e possui em torno de 20 Kb de comprimento, com duas grandes ORFs (*Opening Reading Frame* - janela aberta de leitura). O segmento 7 Kb restante do genoma consiste de cinco genes: gene 2 (gene da glicoproteína da espícula - proteína S), gene 3, gene 4 (gene da proteína da membrana - M), gene 5 e gene 6 (gene da proteína do nucleocapsídeo - N). Os genes 3 e 5 contêm três (3a, 3b e 3c) e duas (5a e 5b) ORFs respectivamente (Figura 2).

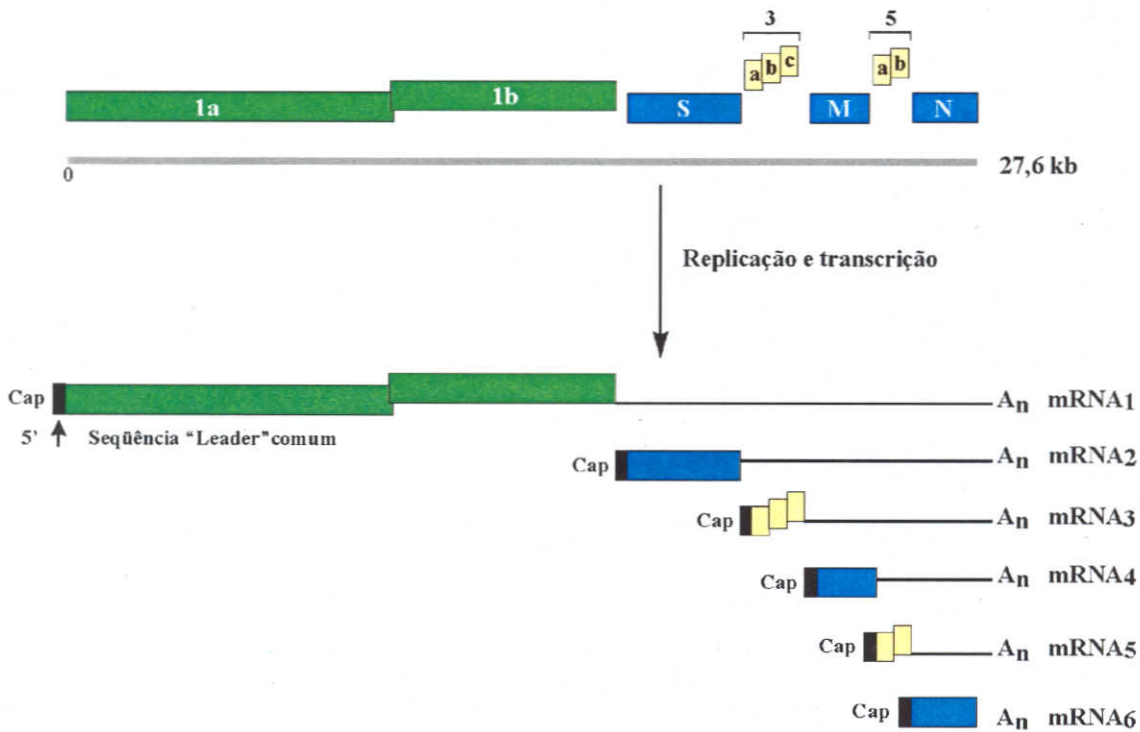


Figura 2 - Organização e expressão do genoma do vírus da bronquite infecciosa das galinhas (VBIG) e seus RNAs mensageiros (mRNAs) subgenômicos. Fonte: LIU *et al.* (1991).

Com exceção do gene 3c, que mostrou codificar a pequena proteína da membrana (E) (SMITH *et al.*, 1990; LIU & INGLIS, 1991), os produtos de todas as outras ORFs permanecem desconhecidos (JIA & NAQI, 1997). Em sua extremidade 5', o genoma do VBIG apresenta-se capeado e o RNA inicia com uma seqüência *leader* de 65 a 98 nucleotídeos, que também está presente na terminação 5' dos mRNAs, seguida por uma região não traduzida (UTR) de 200 a 400 nucleotídeos. Por outro lado, na extremidade 3' do genoma encontra-se uma UTR de 200 a 500 nucleotídeos seguida pela cauda de poli A.

2.3 Replicação do VBIG

O *Coronavirus* possui estratégia de replicação característica, o que resulta em alta freqüência de recombinação (MAKINO *et al.*, 1986).

O VBIG foi alvo de inúmeras pesquisas realizadas na tentativa de elucidar o mecanismo pelo qual este vírus replica (UPPAL & CHU, 1970; PURCELL & CLARKE, 1972). De acordo com DALES (1973), viropexia e fusão do envelope viral com a membrana celular são as duas principais vias de penetração do VBIG nas células. Os vírions infecciosos adsorvem às membranas celulares através da proteína S, provavelmente através da subunidade S1, que tem sido associada a funções de neutralização viral e hemaglutinação. Sendo o genoma do VBIG infeccioso e codificado para a função polimerase, a liberação do nucleocapsídeo no citoplasma de células infectadas é seguida pela tradução de genes da polimerase do RNA genômico (STERN & KENNEDY, 1980). Duas grandes ORFs codificando as unidades da polimerase são traduzidas, a maior via mudança de janela ribossomal, como única poliproteína

que depois é clivada (LAI & CAVANAGH, 1997). Essas proteínas se unem para formar a polimerase ativa. O RNA genômico senso positivo é primeiramente transcrito em RNAs intermediários, senso negativo. O RNA senso negativo serve como molde para a transcrição do RNA genômico e de mRNAs subgenômicos. A replicação ocorre exclusivamente no citoplasma, sendo produzidos cinco mRNAs subgenômicos por mecanismo de transcrição descontínua que pode gerar recombinantes (CAVANAGH *et al.*, 1986). Os mRNAs subgenômicos possuem terminações 3' idênticas mas que estendem-se em diferentes comprimentos na direção 5', também compartilhando uma seqüência *leader* (LAI, 1990). Os mRNAs subgenômicos são utilizados como mRNAs para a tradução de proteínas remanescentes, em particular as proteínas estruturais requeridas para a montagem

do vírion. As partículas víricas são produzidas por mecanismo no qual a seqüência *leader* é promotora da transcrição. A formação do vírion ocorre por processo de brotamento nas membranas do retículo endoplasmático e não na superfície celular. É a localização da proteína M no retículo endoplasmático que dita que a formação do vírion ocorre nesta região. Os vírions acumulam-se em pequenas vesículas, mas o mecanismo da sua liberação da célula é desconhecido. Novos vírus começam a aparecer três a quatro horas após a infecção, sendo alcançada a produção máxima por célula dentro de 12 h a 37°C (KING & CAVANAGH, 1991). A Figura 3 mostra o ciclo de replicação do VBIG.

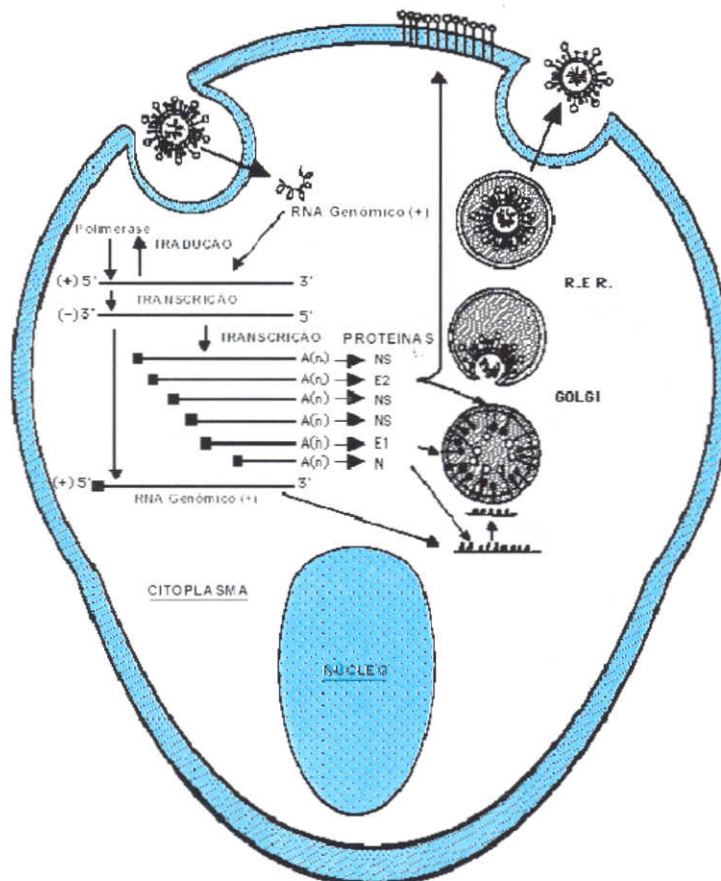


Figura 3 - Ciclo de replicação do vírus da bronquite infecciosa das galinhas (VBIG). A figura foi obtida via internet. (<<http://www-micro.msb.le.ac.uk/335/Coronaviruses.html>>).

2.4 Heterogeneidade Genética do VBI

Os vírus RNA são conhecidos por sofrerem rápida mudança genética (LAI, 1992). Provavelmente, devido ao grande tamanho do genoma RNA, o *Coronavirus* desenvolve variados mecanismos genéticos, entre os quais a recombinação, para manter a estabilidade, gerando, conseqüentemente, diversidade (LAI & CAVANAGH, 1997). A ausência de atividade exonuclease que corrija a má incorporação de nucleotídeos durante a replicação resulta em alta frequência de erros que oscilam na ordem de um erro por 10.000 nucleotídeos incorporados. Acredita-se que a perda deste mecanismo *proof-reading* em RNA polimerases seja responsável por altas frequências de mutações pontuais entre os vírus RNA e fornece mecanismo para a evolução antigênica e patogênica (HOLLAND *et al.*, 1982). Isto implica que o genoma de um vírus RNA não seja entidade única e sim a média ou o consenso na população de moléculas de RNA. Isto conduz à definição do termo *quasispecies* que descreve esta variabilidade genética. Muitos dos genomas virais nas *quasispecies* não são sequer viáveis devido a substituições que são letais para o genoma. Esta característica permite ao vírus RNA gerar genomas que potencialmente possuam melhor capacidade adaptativa. As conseqüências desse processo são vistas na prática, como o aparecimento de mutantes que escapam à neutralização por anticorpos, sendo estes vírus antigênicamente diferentes das amostras vacinais.

O extensivo uso de vacinas vivas atenuadas exerce importante papel no crescente número de novas variantes genéticas, pois o uso dessas vacinas pode levar à seleção de populações virais capazes de escapar à neutralização por anticorpos induzidos por vacinas (KUSTERS *et al.*, 1987; WANG *et al.*, 1993).

Com RT-PCR, análise por RFLP e seqüenciamento de DNA, NIX *et al.* (2000) demonstraram a presença de subtipos do sorotipo Ark em duas amostras comerciais da vacina Ark-DPI e em estoques da mesma amostra presentes no laboratório. A demonstração do subtipo Ark e das amostras de referência na amostra Ark-DPI comprova a existência de *quasispecies* do VBI.

Apesar do uso rotineiro de vacinas, continuam acontecendo surtos de VBI em aves vacinadas (GELB, 1989). Estes surtos são, freqüentemente, o resultado de infecções que diferem sorologicamente da amostra vacinal. Proteção sólida contra o desafio homólogo do VBI tem sido relatada (HOFSTAD, 1975). Entretanto, o desafio com isolados virais heterólogos tem resultado em proteção variável (0 a 80%) em galinhas infectadas (HOFSTAD, 1981). Isto sugere a diversidade dos determinantes antigênicos associados à imunidade em isolados do VBI (LASHGARI & NEWMAN, 1984).

Na Holanda, no período compreendido entre 1978 e 1982, o vírus foi isolado de 162 plantéis suspeitos, apesar da vacinação contra o VBI, com as amostras H52 e H120 (DAVELAAR *et al.*, 1984). Testes de vírus-neutralização cruzada mostraram que a maioria (67%) dos isolados pertencia a sorotipos diferentes dos sorotipos Massachusetts, Connecticut, Florida, Iowa 97, Iowa 609 e JMK e puderam ser divididos em quatro sorogrupos denominados D207, D212, D3128 e D3896. Experimentos demonstraram que a vacinação com a amostra H120 não foi capaz de proteger galinhas contra os efeitos adversos do desafio com os novos sorotipos.

A diversidade genética entre os sorotipos, e até mesmo dentro do grupo sorológico, foi inicialmente indicada por análises *fingerprinting* do RNA (CLEWLEY *et al.*, 1981; BUTCHER *et al.*, 1990). Entretanto, regiões específicas de variabilidade, bem como relações filogenéticas de amostras do VBI, têm sido identificadas por análises de seqüências nucleotídicas (CAVANAGH *et al.*, 1988; KUSTERS *et al.*, 1989).

A diversidade antigênica do VBI e sua importância na epidemiologia da VBI têm sido reconhecidas desde que JUNGHER *et al.* (1956) descreveram diferenças antigênicas entre os sorotipos Massachusetts e Connecticut. A variabilidade genética da subunidade S1 do envelope representa mecanismo adaptativo do VBI a pressões seletivas associadas a intensiva prática de vacinação e outras práticas de manejo (GELB *et al.*, 1991). Como resultado, muitos sorotipos do vírus são reconhecidos e sorotipos variantes adicionais continuam surgindo e causando doença.

Acredita-se que a evolução do VBIg seja complexa, sendo influenciada por diversos fatores, tais como o uso de diversas amostras para vacinação, densidade populacional e estado imune do hospedeiro (SAPATS *et al.*, 1996). Variações resultando em mudanças evolucionárias são conseqüências tanto de modificações ocorridas no genoma, como do resultado de pressões ambientais sobre o vírus (WANG *et al.*, 1994). Mutações de ponto, deleções, inserções e recombinação contribuem para a evolução de amostras do VBIg (KUSTERS *et al.*, 1990; CAVANAGH *et al.*, 1992; WANG *et al.*, 1993). Modificações mais rápidas na composição genética de muitos vírus, incluindo *Coronavirus*, podem ocorrer como resultado de eventos de recombinação (LAI, 1992). Amostras do VBIg podem sofrer substituições de grandes fragmentos genômicos em múltiplos genes (KUSTERS *et al.*, 1990; WANG *et al.*, 1993; JIA *et al.*, 1995). Infecções mistas por amostras de campo e vacinais podem levar a eventos de recombinação (KUSTERS *et al.*, 1990; CAVANAGH *et al.*, 1992). Diversos isolados têm sido identificados como possuidores de segmentos genômicos derivados de dois diferentes isolados (LEE & JACKWOOD, 2000). Pelo fato de o VBIg poder disseminar-se tão rapidamente, ser altamente infeccioso e poder persistir por várias semanas na galinha, ele claramente possui o potencial para que ocorra a recombinação. Existem evidências, tanto de estudos laboratoriais (CAVANAGH *et al.*, 1992), bem como de observações de campo (CAVANAGH *et al.*, 1991; WANG *et al.*, 1993), de que a recombinação de fato deve ocorrer com as amostras do VBIg. A amostra do VBIg CU-T2, que aparentemente originou-se do sorotipo Arkansas, sofreu recombinação em dois genes, expressando epitopos tanto do sorotipo Ark quanto do sorotipo Mass na proteína S1 (JIA *et al.*, 1995). BANNER *et al.* (1990) mostraram que a recombinação de RNA ocorreu preferencialmente em certos sítios no genoma do coronavírus murino. Este *hot-spot* também foi observado na amostra CU-T2 do VBIg (JIA *et al.*, 1995).

KOTTIER *et al.* (1995) co-infectaram ovos embrionados com duas amostras do VBIg (BEAUDETTE e M41) para verificar se poderia ocorrer recombinação entre as duas amostras. Os achados não somente reforçaram que a recombinação ocorre durante a replicação do

VBIg e contribui para a sua diversidade, como também mostraram que a recombinação entre *Coronavirus* não é limitada ao vírus da hepatite murina. Deste modo, a variação antigênica dentro do VBIg pode ocorrer por dois mecanismos, mutação e recombinação, sendo de importância prática quando ocorre dentro do gene S. Diferenças entre sorotipos do VBIg estão associadas a mudanças na seqüência da glicoproteína S (KUSTERS *et al.*, 1987).

Os epitopos que definem o sorotipo são formados por aminoácidos dentro do primeiro e terceiro quartos da subunidade S1 (KANT *et al.*, 1992). É nessas regiões que a maioria das diferenças entre aminoácidos ocorrem entre e dentro dos sorotipos (CAVANAGH, 1995). Frequentemente, mas não invariavelmente, os sorotipos diferem em 20 a 25% em relação aos aminoácidos de S1. A porção amino-terminal de S1 é a mais variável (região hipervariável) diferindo entre os sorotipos em 35% ou mais de aminoácidos. Tais diferenças sugerem que o VBIg muta rapidamente (CAVANAGH *et al.*, 1998).

Existem muitos sorotipos diferentes do VBIg em todo o mundo e, em cada área geográfica, provavelmente, predominam sorotipos diferentes. O tipo predominante altera-se continuamente e, pelo fato de o VBIg ser coronavírus, as indicações são de que novos sorotipos continuarão a surgir no futuro (COOK, 1998).

Embora cada área geográfica pareça ter o seu(s) próprio(s) sorotipo(s) particular(es) de VBIg, mais de um sorotipo pode ser predominante na mesma área ao mesmo tempo (GELB *et al.*, 1991), enquanto o sorotipo predominante em qualquer área, em particular, muda com o tempo. Novos sorotipos de VBIg continuam a ser descritos em todas as partes do mundo, inclusive no Brasil. Até hoje, foram identificados mais de 30 sorotipos do VBIg (VAN DER SLUIS & HUNTON, 2000; JACKWOOD, 2000), que não oferecem imunidade cruzada satisfatória. Até a década de 70, o sorotipo Massachusetts era considerado como sendo o que conferia melhor proteção contra os outros (HOFSTAD, 1975).

Estudos moleculares com o VBIg têm mostrado que novos sorotipos e genótipos do VBIg podem surgir como resultado de mudanças ou mutações

na seqüência de aminoácidos do gene da espícula, enquanto o restante do vírus permanece inalterado (CAVANAGH *et al.*, 1992; CAVANAGH, 1995). Com base neste relato, a possibilidade do aparecimento de novas amostras variantes sempre existe (SONG *et al.*, 1998).

Novas amostras variantes têm sido isoladas e caracterizadas em diversas partes do mundo, inclusive na Europa e Itália (GOUGH *et al.*, 1992; CAPUA *et al.*, 1994), enquanto algumas parecem persistir através dos anos (CISLAGHI *et al.*, 1997) e outras parecem reemergir após períodos de não-deteção (GOUGH *et al.*, 1996).

Devido à capacidade de o VBIg alterar o caráter antigênico tão rapidamente, o vírus ainda tem a vantagem, e será necessária vigilância ininterrupta para se manter o problema da BIG sob controle no futuro.

2.5 A Doença

A BIG, definida como doença da lista B pelo Escritório Internacional de Epizootias (OIE), é doença viral aguda, altamente contagiosa, de distribuição mundial, com grande impacto econômico e sanitário para galinhas de todas as idades, causando alterações respiratórias e reprodutivas, sendo alguns sorotipos capazes de produzir lesões musculares e renais (nefrite-nefrose). Em aves jovens, caracteriza-se por provocar quadro respiratório agudo com estertores e dispnéia. As aves em postura mostram menores problemas respiratórios, no entanto sofrem queda brusca na produção de ovos assim como redução na qualidade interna e externa dos mesmos (MUNEER *et al.*, 1987; BOX *et al.*, 1988).

Os únicos hospedeiros naturais do VBIg são da espécie *Gallus gallus domesticus*. Todas as idades são susceptíveis, embora a doença clínica seja mais grave em pintos jovens. A medida em que as aves vão crescendo, tornam-se mais resistentes aos efeitos nefropatogênicos, lesões de oviduto e mortalidade devida à infecção (CRINION & HOFSTAD, 1972; ALBASSAM *et al.*, 1986).

O período de incubação é de 18 a 36 horas, dependendo da dose e via de inoculação. A disseminação natural geralmente requer em torno

de 36 h ou mais (HOFSTAD, 1984). O VBIg dissemina-se rapidamente entre as galinhas do plantel, sendo que as aves susceptíveis geralmente desenvolvem sinais dentro de 48 h (CUNNINGHAM, 1970).

A morbidade é geralmente alta em galinhas de todas as idades, sendo que a mortalidade alta (10 – 30%) ocorre em galinhas com menos de seis semanas de idade. Quando outros patógenos (*Mycoplasma sp.*, *Escherichia coli*) estão também presentes, a morbidade e mortalidade são maiores (KING & CAVANAGH, 1991).

Diversos fatores intrínsecos (idade e linhagem) e extrínsecos (nutrição, ambiente e infecções intercorrentes) influenciam a patogênese das infecções por VBIg (DHINAKAR RAJ & JONES, 1997).

A replicação do VBIg no trato respiratório das galinhas causa sinais clínicos característicos, porém não patognômicos, tais como dificuldade respiratória, tosse, descarga nasal e estertores traqueais.

Amostras de VBIg causam lesões renais que, em alguns casos, podem ser muito graves (ALEXANDER *et al.*, 1978; BROWN *et al.*, 1987; COWEN *et al.*, 1987). A nefrite pelo VBIg ocorre principalmente em frangos de corte, podendo afetar, também, frangas em crescimento (CUMMING, 1963; BROWN *et al.*, 1987) e até mesmo poedeiras adultas (CUMMING, 1963; COWEN *et al.*, 1987). Em frangos de corte, geralmente a doença inicia-se rapidamente com leves sinais respiratórios. Em torno de 5-7 dias mais tarde, quando os sinais respiratórios tendem a diminuir, a mortalidade começa a aumentar dramaticamente.

O VBIg, inclusive a amostra M41, pode infectar diversos tecidos e algumas amostras podem, freqüentemente, ser isoladas dos tecidos do trato digestivo, particularmente das tonsilas cecais (LUCIO & FABRICANT, 1990). O VBIg pode ser isolado de tecidos renais tanto na presença quanto na ausência de lesões (JULIAN & WILLIS, 1969; COWEN *et al.*, 1971; JONES, 1974; WINTERFIELD & ALBASSAM, 1984) e de diversas fontes: baço (COOK, 1971), fezes, swabs cloacais e tonsilas cecais (ALEXANDER & GOUGH, 1977; ALEXANDER *et al.*, 1978; COOK, 1984; LUCIO & FABRICANT 1990), e sêmen (COOK, 1971). Foi

relatado que linfócitos são susceptíveis à infecção *in vitro* pelo VBI (MORA, 1966). EL-HOUADFI *et al.* (1986) relataram a presença da amostra G no esôfago, proventrículo, duodeno, jejuno, íleo, tonsilas cecais; bolsa de Fabrício, cloaca, traquéia e rins de galinhas infectadas.

Os sorotipos T Australiana, Holte, Gray e uma variante recentemente identificada nos Estados Unidos, entre outros descritos mundialmente, afetam os rins, sendo o sorotipo T Australiana mais patogênico. Integrantes do sorotipo Massachusetts podem ou não produzir certo dano renal, porém o vírus é isolado com facilidade a partir dos rins (QUIROZ, 1999).

Estudos envolvendo a virulência e tropismo de diferentes amostras do VBI para o trato reprodutivo de galinhas são escassos (MCMARTIN, 1993). Evidência para diferenças entre amostras na virulência para o oviduto foi relatada por CRINION & HOFSTAD (1972): as amostras Massachusetts e T Australiana foram virulentas, enquanto as amostras Connecticut e Iowa 609 não. Passagens seriadas da amostra Massachusetts em OEG/SPF reduziram a sua virulência para o oviduto (CRINION & HOFSTAD, 1972).

A classificação de sorotipos do VBI tem merecido muita atenção, embora a relação entre sorotipos e patogenicidade não seja bem conhecida (DHINAKAR RAJ & JONES, 1996). Com a constante emergência de novos sorotipos e variantes (COOK, 1984; COOK & HUGGINS, 1986), é importante conhecer a patogenicidade de novos isolados para escolher a vacina eficaz.

Mais recentemente, novos sorotipos do VBI têm sido identificados causando quadros atípicos da doença, como o sorotipo 4/91 (ou 793/B), isolado na Grã - Bretanha, que é capaz de provocar a morte em aves adultas sem a intervenção de outros patógenos (QUIROZ, 1999). Esta importante amostra variante foi isolada de frangos de corte apresentando miopatia bilateral dos músculos peitorais superficiais e profundos (GOUGH *et al.*, 1992).

2.6 Histórico

Em 1931 SCHALK & HAWN descreveram doença respiratória, aparentemente nova, em aves jovens

(2 dias a 3 semanas de idade), no Estado da Dakota do Norte (EUA), com mortalidade variando entre 40 a 90%. Na época, a natureza do agente infeccioso não foi determinada. Após essa primeira observação, a doença foi identificada em diversos estados, tendo sido, dois anos mais tarde, mencionada por BUSHNELL & BRANDLY (1933), que a confundiram com a laringotraqueíte. Tal confusão foi desfeita quando estudos de imunidade cruzada em galinhas foram realizados por BEACH & SCHALM (1936) diferenciando o VBI do vírus da laringotraqueíte e do agente da coriza infecciosa.

Em 1951, a doença já era considerada de grande importância econômica para a avicultura industrial, principalmente em área de alta densidade avícola, sendo-lhe atribuídas perdas por mortalidade, mau desenvolvimento, queda na produção e na qualidade dos ovos (VAN ROECKEL *et al.*, 1951).

JUNGHER *et al.* (1956) descreveram diferenças imunológicas entre duas amostras do VBI e propuseram que fossem designadas como Massachusetts e Connecticut. Estas foram, por algum tempo, aceitas como os únicos tipos imunológicos do VBI. Mais tarde, outros tipos foram descritos. HOFSTAD (1958) relatou as amostras Iowa 97 e 609, Winterfield & Hitchner (1962) descreveram os tipos GRAY E HOLTE. Em 1964, WINTERFIELD *et al.* (1964) descreveram o isolado JMK como sendo distinto dos outros anteriormente descritos. HOPKINS (1969) propôs o isolado SE-17 como representante de novo sorotipo do VBI.

A associação do VBI com nefrite em galinhas foi mostrada pelo isolamento do vírus de rins de aves naturalmente infectadas. WINTERFIELD & HITCHNER (1962) foram os primeiros a relatarem a nefrose associada à BIG nos Estados Unidos. No mesmo ano, CUMMING (1963) relatou epidemia da doença causando severas lesões renais em galinhas na Austrália. Desde então, várias amostras nefropatogênicas do VBI têm sido identificadas no mundo inteiro.

Em 1984, amostras nefropatogênicas do VBI foram isoladas na Bélgica e rapidamente disseminaram através da França. A mortalidade foi superior a 30 % (LAMBRECHTS *et al.*, 1993).

Na Coreia, os primeiros surtos da BIG foram relatados em 1986 e amostras nefropatogênicas do VBIG foram reconhecidas em 1990 (SONG *et al.*, 1998). Também em 1990 amostras nefropatogênicas associadas a 2-12% de mortalidade em frangas de 3-4 semanas de idade foram isoladas na Califórnia. Não demorou muito antes da doença ser relatada em outros países e é agora considerada como tendo distribuição mundial e parece ser endêmica em muitas regiões do mundo (VAN DER SLUIS & HUNTON, 2000).

2.7 Situação no Brasil

No Brasil, o primeiro isolamento do VBIG foi realizado por HIPÓLITO (1957), no estado de Minas Gerais. A partir daquela data outros trabalhos foram efetuados no sentido de se estabelecer a prevalência da BIG em nosso país (HIPÓLITO, 1973).

Em granjas do estado de São Paulo, alta prevalência de anticorpos anti-VBIG foi constatada. Estudos sobre os aspectos clínicos e anátomo-patológicos da "síndrome nefrite-nefroze" foram descritos (HIPÓLITO, 1973).

Devido à ampla disseminação da doença em todo o país, em 1980, foi iniciada a vacinação contra a BIG, usando-se para tal, a amostra importada Holland (H-120). No Brasil, os resultados não foram satisfatórios, apesar da redução significativa dos problemas associados à doença (WENTZ, 1988; DI FÁBIO, 1993).

Antes e após a introdução oficial da vacina no Brasil, 15 amostras do VBIG foram isoladas no Estado de Minas Gerais. RESENDE (1983) realizou trabalho de patogenia comparada com duas delas. Outros estudos, utilizando essas mesmas amostras, ou parte delas, foram realizados por PANIAGO (1994), EPIPHANIO (1998) e SOUZA (1999), mostrando a presença de amostras distintas da amostra vacinal. Estas mesmas amostras foram caracterizadas por RESENDE *et al.* (1998) como VBIG por RT-PCR de parte do gene S2.

A presença de novos sorotipos tem sido descrita, também, 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).

2.8 Importância Econômica

O VBIG induz a altas perdas econômicas na avicultura industrial devido à doença respiratória grave, síndrome nefrite-nefroze e queda de postura, os quais são agravados com sinergismo viral e bacteriano. As perdas econômicas devidas ao VBIG são mais sérias quando a infecção do trato respiratório é complicada pela infecção secundária com *Mycoplasma gallisepticum* e/ou *Escherichia coli* (KING & CAVANAGH, 1991). Quando o VBIG é componente de infecções mistas com *Escherichia coli*, geralmente ocorre aerossaculite, resultando em condenações ao abate (KING & CAVANAGH, 1991).

Em galinhas de postura comercial, a doença adquire enorme importância econômica devido aos prejuízos causados na produção de ovos, refletindo-se tanto na quantidade quanto na qualidade externa e interna dos ovos, e conseqüente depreciação dos mesmos. Embora a morbidade seja alta, a mortalidade é, geralmente, baixa em poedeiras. Entretanto, algumas vezes, observa-se alta mortalidade em galinhas jovens devido às manifestações respiratória ou renal da infecção (CAVANAGH & NAQI, 1997). Pintinhos de postura infectados precocemente com determinados sorotipos do vírus podem adquirir forma mais rara da doença, associada à atrofia ou deformação do oviduto, que resulta em plantel que não atinge os índices esperados de produção. Em frangos de corte, a doença adquire principalmente caráter respiratório, geralmente exarcebada pela presença de *Mycoplasma gallisepticum* ou *Mycoplasma synoviae* e/ou *Escherichia coli*, causando mortalidade, atraso no crescimento e alta condenação no abatedouro. Alguns sorotipos de VBIG induzem quadro renal que pode ser acompanhado de sinais respiratórios, resultando em alta mortalidade (30%) com aumento do volume dos rins, apresentando acúmulo de uratos no parênquima e ureteres (MARTINS, 1992).

A alta prevalência nacional e internacional da BIG na indústria avícola tem obrigado o uso de programas preventivos com vacinas vivas atenuadas e/ou inativadas. No entanto, apesar disto, a BIG continua provocando importante

impacto econômico negativo, especialmente em poedeiras (HIDALGO, 1997).

A grande capacidade de variação genética que apresenta o VBIG tem determinado o aparecimento de diversos sorotipos antigenicamente diferentes. Deste modo, existem ocasiões em que amostras vacinais do vírus de determinado sorotipo não protegem as galinhas contra amostras de campo de sorotipos diferentes, apresentando, então, "quebra" de imunidade e perdas de produtividade.

Tanto em estudos experimentais, como em surtos naturais da BIG, têm-se verificado quedas na produção de ovos que variam de 3 a 40% em galinhas adultas, dependendo do estado vacinal dos plantéis. Avaliado de outra forma, isto pode significar a perda de 2 a 13 ovos/galinha alojada. Paralelamente, pode haver de 1,5 a 10% de ovos com deterioração da casca, podendo apresentar-se trincados e, inclusive, com aparecimento de ovos sem casca. Importante porcentagem dos ovos apresenta alterações da albumina, que aparece mais fluida e disforme, conferindo aspecto de envelhecimento aos ovos.

A maioria das amostras do VBIG possui tropismo pelo trato respiratório superior e trato reprodutivo das galinhas com as conseqüências referidas anteriormente. No entanto, nos últimos 15 anos, e em diversos países, tem-se observado com maior freqüência o aparecimento de surtos de BIG causados por amostras nefropatogênicas. Estas amostras agregam outro fator de perdas econômicas aos lotes de aves afetadas que é a mortalidade. Lotes de frangas de reposição afetadas por surtos agudos e subagudos de nefrite-nefroze têm apresentado até 14% de mortalidade. Em outras ocasiões, esta síndrome afeta galinhas no início da produção e, além da queda na produção de ovos, a mortalidade mensal pode aumentar em duas a três vezes durante todo o período. Isto significa que um lote de galinhas pode terminar com 25 a 30% de mortalidade acumulada, devido a esta forma crônica da BIG.

Os danos econômicos da BIG não somente estão restritos ao lote de aves afetadas, mas também repercutem em toda a cadeia de produção avícola, incluindo a comercialização e distribuição dos ovos. Aliado a isso, verifica-se aumento dos custos de produção devido à

necessidade de utilizar medicamentos e medidas especiais de manejo para minimizar os efeitos da doença.

2.9 Diagnóstico

O diagnóstico de determinadas infecções virais é dificultado pela escassez de procedimentos diagnósticos com sensibilidade e especificidade adequadas. O isolamento e subseqüente cultivo de alguns vírus envelopados são freqüentemente fracassados devido à instabilidade de tais vírus (FENNER *et al.*, 1993).

O VBIG é grande causador de perdas econômicas à indústria avícola e pode estar envolvido em doença respiratória, nefrite e queda na produção e na qualidade dos ovos. Entretanto, estes sinais não são específicos ao VBIG. Por esta razão, são necessárias ferramentas de diagnóstico para identificar infecções por VBIG em relação a problema clínico no campo.

A detecção de infecções víricas pode ser realizada por métodos diretos e indiretos. Com os métodos diretos, podem-se detectar as partículas víricas ou alguns de seus componentes na amostra. Os métodos indiretos são usados para detectar a presença de anticorpos frente ao vírus. Mediante aplicação simultânea de métodos diretos e indiretos, em geral, consegue-se diagnóstico confiável. No entanto, em alguns casos, inclusive aplicando ambos métodos, o diagnóstico é ineficaz e muito complicado.

Existe grande número de testes para o diagnóstico de infecções agudas pelo VBIG. Os testes de inibição de hemaglutinação (IH) (ALEXANDER & CHETTLE, 1977; KING & HOPKINS, 1983; KING & HOPKINS, 1984), imunodifusão em ágar gel (AGP) (KING & CAVANAGH, 1991) e ELISA (KARACA *et al.*, 1990; CARDOSO *et al.*, 1997; NDIFUNA *et al.*, 1998; SOUZA, 1999) são utilizados para a detecção de anticorpos específicos anti-VBIG e a imunofluorescência (YAGYU & OHTA, 1990), microscopia eletrônica (STERN & SEFTON, 1982) e *immunoblotting* (dot-blot) (NIESTERS *et al.*, 1987; MUNEER *et al.*, 1988) são usados para a detecção de antígenos ou partículas víricas do VBIG.

Apesar de serem muito utilizados na prática, estes testes têm levado a resultados conflitantes.

O teste de AGP possui baixa sensibilidade em jovens pintos e não se correlaciona muito bem com testes sorológicos (GOUGH & ALEXANDER, 1978; WILCOX *et al.*, 1983). O teste IH irá demonstrar anticorpos 7 a 14 dias após a infecção (KING & HOPKINS, 1983). Uma vez que a maioria das infecções com VBIg ocorre dentro de três a cinco semanas, o intervalo máximo entre infecção e coleta de amostras de sangue é de somente uma a três semanas. Isto significa que o diagnóstico de infecção por VBIg pelo teste IH frequentemente falha. Ao contrário, após a infecção, o ELISA possui alta sensibilidade e detecta anticorpos anti - VBIg mais cedo que o teste IH (PERROTA *et al.*, 1988).

O diagnóstico sorológico (monitoramento sorológico) indica a ocorrência de exposição das aves ao VBIg e é realizado via detecção de anticorpos produzidos em resposta à infecção pelo vírus. A sorologia é método mais indicado na monitoria da imunidade nos lotes, apesar de ter menor valor diagnóstico da ocorrência de surto da doença do que métodos de isolamento viral ou PCR, uma vez que os anticorpos persistem por longo período após a infecção e pelas evidências da alta soroprevalência do VBIg em plantéis de aves comerciais.

O diagnóstico convencional do VBIg é baseado no isolamento e identificação viral em OEG/SPF (GELB, 1989). O isolamento viral e a identificação pelo teste de vírus neutralização são definitivos para o diagnóstico do VBIg, porém são demorados e laboriosos porque a maioria das amostras de campo do VBIg não é adaptada em embriões de galinha. Frequentemente duas ou três passagens em ovos embrionados são requeridas antes que as amostras do VBIg possam produzir lesões típicas (KING & CAVANAGH, 1991).

Alternativamente, o VBIg pode ser isolado pela inoculação em cultura de anéis de traquéia (Epiphany, 1998). Este método é sensível (COOK *et al.*, 1976), porém laborioso. O VBIg também pode ser detectado diretamente em tecidos de aves infectadas pela imunohistoquímica - IHC (YAGYU & OHTA, 1990; NAKAMURA *et al.*, 1991; CHEN *et al.*, 1996) ou hibridização *in situ* (COLLISSON *et al.*, 1990).

Os avanços que se têm obtido na biologia molecular têm contribuído para o desenvolvimento de novas técnicas de diagnóstico altamente sensíveis. Na última década do século passado, vários métodos baseados em biologia molecular foram introduzidos para o diagnóstico virológico, sendo o primeiro deles a hibridização de ácidos nucleicos.

Na história do diagnóstico baseado na detecção de DNA, o ano de 1985 é especialmente importante. Neste ano apareceu o primeiro trabalho sobre a PCR (SAIKI *et al.*, 1985). O enorme impacto que tem tido esta técnica de biologia molecular não se pode comparar ao de nenhuma outra.

A RT-PCR utilizando sonda de DNA marcada com biotina foi usada para a detecção do genoma do VBIg a partir de líquido alantoidiano e *swabs* traqueais (ANDREASEN *et al.*, 1991; JACKWOOD *et al.*, 1992; KWON *et al.*, 1993).

A RT-PCR tem se mostrado poderosa ferramenta na detecção de diversos vírus RNA (CAVANAGH, 1993). A RT-PCR realizada sobre o VBIg extraído do líquido alantoidiano é promissor método de diagnóstico, tendo sido aplicada por JACKWOOD *et al.* (1992) e por ADZHAR *et al.* (1996). O desenvolvimento de métodos de RT-PCR aplicados diretamente em tecidos ainda está em desenvolvimento (CAVANAGH *et al.*, 1997; FALCONE *et al.*, 1997), merecendo maiores avaliações.

Os métodos laboratoriais de diagnóstico do VBIg possuem várias desvantagens e com isso, faz-se necessária utilização de técnicas que oferecem maior sensibilidade, especificidade, confiabilidade e rapidez.

O método de diagnóstico baseado na RT-PCR é rápido, sensível e específico para a infecção pelo VBIg e tem se tornado a ferramenta mais comum para o diagnóstico e pesquisa (SONG *et al.*, 1998).

2.9.1 Reação em cadeia pela polimerase - PCR

A base teórica da PCR foi descrita pela primeira vez na década de 70. Entretanto, esta técnica não

provocou grande interesse até meados dos anos 80 quando KARY MULLIS e pesquisadores da *Perkin Elmer - Cetus Corporation* (EUA) desenvolveram a técnica (SAIKI *et al.*, 1985, 1988) que rapidamente revolucionou e se tornou ferramenta básica da pesquisa em biologia molecular, pois possibilitou nova estratégia na análise de genes por meio de método simples e rápido de amplificação de seqüências.

A técnica de PCR, descrita por SAIKI *et al.* (1988), envolve a síntese enzimática *in vitro* de milhões de cópias de um segmento específico de DNA na presença de uma DNA polimerase catalisando a extensão 5' → 3' do iniciador tendo como DNA molde uma fita do DNA com o iniciador anelado. Pelas suas propriedades de termoestabilidade, a enzima de uso mais comum é a *Taq* DNA polimerase, produzida pela bactéria *Thermus aquaticus*. A reação se baseia no anelamento e na extensão enzimática de oligonucleotídeos utilizados como iniciadores, que delimitam a seqüência de DNA de fita dupla alvo da amplificação. Estes iniciadores são sintetizados artificialmente de maneira que suas seqüências de nucleotídeos sejam complementares a seqüências específicas que flanqueiam a região alvo.

Um ciclo de PCR envolve três etapas: desnaturação, anelamento e extensão. A fita dupla do DNA alvo é desnaturada pela elevação da temperatura para 92°C a 95°C. Na etapa de anelamento, a temperatura é rapidamente reduzida para 35°C a 60°C, dependendo essencialmente do tamanho e seqüência do oligonucleotídeo utilizado, permitindo a hibridização DNA-DNA de cada iniciador com as seqüências complementares que flanqueiam a região alvo. Em seguida, a temperatura é elevada para 72°C para que a enzima *Taq* DNA polimerase realize a extensão a partir de cada terminal 3' dos oligonucleotídeos. Esta extensão envolve a adição de nucleotídeos utilizando como molde a seqüência-alvo, de maneira que cópia desta seqüência seja feita no processo. Este ciclo é repetido várias vezes. Uma vez que a quantidade de DNA da seqüência alvo dobra a cada ciclo, a amplificação segue progressão geométrica, depois de apenas 30 ciclos, é produzida mais de um milhão de vezes a quantidade inicial de seqüência alvo (OSTE, 1988; PURCHASE, 1989). Esta escala de amplificação permite, portanto, iniciar com

quantidades mínimas de DNA (da ordem de alguns picogramas ou nanogramas) e terminar a reação com grandes quantidades de DNA de uma seqüência específica de interesse.

Os primeiros experimentos de PCR foram realizados com o fragmento de Klenow da DNA – polimerase I. A introdução da *Taq* DNA polimerase termoestável de *Thermus aquaticus* (SAIKI *et al.*, 1988) permitiu a automação deste procedimento.

Os primeiros trabalhos do uso de PCR no diagnóstico veterinário apareceram no final dos anos 80. O diagnóstico de doenças virais aconteceu, então, rapidamente. PCR é técnica especialmente recomendável, uma vez que os métodos de diagnóstico tradicionais requerem longos e complexos procedimentos. Por sua vez, PCR pode detectar pequenas quantidades de DNA e RNA viral nas infecções, mesmo quando latentes e integrados nos DNAs e RNAs genômicos do hospedeiro (BELAK *et al.*, 1994).

A fidelidade da PCR depende de uma série de fatores. Como qualquer enzima, a *Taq* DNA polimerase necessita de pH ótimo de atividade para que a reação ocorra corretamente. Esse pH é dado pelo tampão escolhido para ser usado na mistura. Pela modificação dos componentes do tampão de reação é possível aumentar a especificidade e qualidade do produto desejado. Melhor amplificação é conseguida na utilização de concentrações entre 20 – 100 M de dNTP devido à baixa probabilidade de incorporação errônea de nucleotídeos durante a reação. Outro fator que afeta a reação é a concentração de magnésio. Esse metal irá afetar o anelamento dos iniciadores ao molde e a desnaturação do DNA. Geralmente, excesso de magnésio resultará em acúmulo de produtos não específicos, enquanto concentração abaixo do necessário resultará em diminuição da quantidade de produto final desejado. Finalmente, o número de ciclos pode afetar a fidelidade do produto final, já que os produtos resultantes da incorporação errônea de nucleotídeos servirão de molde para os próximos ciclos.

A detecção de DNA ou RNA vírus específico pela PCR fornece técnica de diagnóstico sensível e específica e combinada à transcrição reversa tem sido desenvolvida para o diagnóstico de diversos vírus RNA (BELAK & BALLAGI-PORDANY, 1993).

O desenvolvimento de métodos baseados na PCR para detectar vírus RNA foi grande realização. Para isto, seqüências de RNA molde precisam ser transcritas em DNA complementar (cDNA) sendo, então, utilizado como template de DNA na PCR. O passo da transcrição reversa foi originalmente realizado utilizando a transcriptase reversa obtida do vírus da mieloblastose aviária ou do vírus "Moloney" da leucemia murina (MMuLV). A transcriptase reversa, primeiramente descrita em 1970 (Baltimore, 1970), é a enzima responsável pela transcrição do genoma RNA viral para DNA fita dupla que, subsequentemente, é inserido dentro do genoma da célula hospedeira infectada. A transcriptase reversa do MMuLV consiste de única subunidade de 71 kDa, incluindo tanto a polimerase quanto a RNase H, esta última degradando o RNA durante a transcrição reversa. A transcriptase reversa do MMuLV é ferramenta útil em biologia molecular e é utilizada freqüentemente, tanto para a construção de bibliotecas de cDNA (OKAYAMA *et al.*, 1987), quanto para RT-PCR.

No caso do VBIG, uma região genômica específica do vírus foi amplificada por RT-PCR por ANDREASEN *et al.* (1991) utilizando RNA viral altamente purificado. Uma RT-PCR para o diagnóstico do VBIG foi desenvolvida por ZWAAGSTRA *et al.* (1992), JACKWOOD *et al.* (1992) que descreveram métodos rápidos e sensíveis para a extração e detecção do RNA viral de líquidos alantoidianos infectados com VBIG. Além dos importantes aspectos epidemiológicos do VBIG, que podem ser avaliados pela RT-PCR, esta técnica tem inúmeras vantagens de diagnóstico, pois pode ser rápida e específica, substituindo o demorado isolamento e adaptação do VBIG em ovos embrionados.

WANG *et al.* (1999), comparando o teste de imunofluorescência indireta com a RT-PCR para a detecção do VBIG, obtiveram resultados sugestivos de que a RT-PCR é mais sensível que o teste de imunofluorescência, especialmente quando mais de uma amostra do VBIG está envolvida.

Especificidade, sensibilidade, facilidade no uso e redução no tempo indicam este teste como de rotina para propostas de diagnóstico (FALCONE *et al.*, 1997).

2.10 Métodos de Classificação do VBIG

A extensiva variação antigênica é característica do VBIG, portanto, além da detecção de amostras do VBIG, a diferenciação entre essas amostras é também importante para o estabelecimento de estratégias para a prevenção da doença.

Nos últimos 20 anos os métodos para a identificação de sorotipos do VBIG têm sofrido inúmeras modificações (CASE *et al.*, 1997). O primeiro método estabelecido para diferenciar as amostras *in vitro* foi o teste de vírus-neutralização (VN) (CUNNINGHAM, 1977). Outros procedimentos que identificam diferenças entre amostras, tais como testes de redução de placas (HOPKINS, 1974), cultura em anéis de traquéia (DARBYSHIRE, 1979) são relatados, porém não têm sido amplamente utilizados como procedimentos diagnósticos de rotina (CASE *et al.*, 1997).

O teste de IH está disponível em muitos laboratórios e é utilizado rotineiramente para o diagnóstico sorológico da BIG, porém a utilização deste teste para tipificação de amostras de campo do VBIG vem sendo estudada por diversos autores (KING & HOPKINS, 1984; LASHGARI & NEWMAN, 1984; COOK *et al.*, 1987; GOUGH *et al.*, 1992), com resultados conflitantes. Entre as vantagens do teste, apontam-se a rapidez e a simplicidade de sua execução. Entretanto, a incapacidade de algumas amostras do VBIG de apresentarem a hemaglutinação, mesmo após tratamento com fosfolipase C tipo 1 (BROWN & BRACEWELL, 1985; PANIAGO, 1994) e a ocorrência de reações cruzadas entre sorotipos distintos (COOK *et al.*, 1987) têm sido apontadas como obstáculos à utilização deste teste para tipificação de amostras do VBIG.

Para a identificação do sorotipo de VBIG, tradicionalmente, é realizado o isolamento viral em OEG/SPF seguido pelo teste de vírus-neutralização. Embora este teste ainda seja padrão-ouro para a identificação de sorotipos do VBIG, o método é muito laborioso e, algumas vezes, demora-se de quatro a oito semanas para a identificação do sorotipo (JACKWOOD, 1997).

A classificação de amostras do VBIG também pode ser baseada em testes de neutralização viral,

utilizando tanto anticorpos monoclonais quanto policlonais. Utilizando esta técnica, a maioria dos isolados nefropatogênicos em diferentes partes do mundo, durante os últimos 35 anos, têm mostrado ser diferentes do sorotipo Massachusetts e são referidos como amostras variantes (WINTERFIELD & HITCHNER, 1962; CUMMING, 1963; BROWN *et al.*, 1987; LAMBRECHTS *et al.*, 1993). A classificação de amostras em sorotipos utilizando testes de neutralização viral é baseada em características da glicoproteína da espícula do VBIg (CAVANAGH & NAQI, 1997). Análises por RFLP e seqüenciamento do gene S corroboram os resultados obtidos por testes de neutralização (SHAW *et al.*, 1996).

O melhor teste para a sorotipificação do VBIg é, segundo COOK (1998), o teste de VN. Tradicionalmente, tem sido realizado em ovos embrionados, porém o melhor sistema é o cultivo de anéis de traquéia (TOC) (DARBYSHIRE *et al.*, 1979). A leitura deste teste é menos subjetiva, obtém-se o resultado mais rapidamente – três dias em comparação aos sete dias com OEG/SPF – e é mais econômico, já que pelo menos 20 TOCs podem ser obtidas de um embrião. O uso de TOCs tem permitido classificar amostras do VBIg em diferentes sorotipos com muito poucas reações inespecíficas entre eles, o que é freqüente quando se utiliza a SN em OEG/SPF (COOK, 1998).

Testes de VN resultam em menos reações cruzadas e são mais específicos que os testes de IH (COOK *et al.*, 1987). Entretanto, vírus que possuem seqüências do gene S1 extremamente semelhantes podem aparecer não relacionados em testes de VN, levando a conclusões errôneas (CAVANAGH *et al.*, 1992). Deste modo, existem problemas com todos os testes utilizados para a caracterização do VBIg; a combinação de testes é a alternativa mais apropriada (CAPUA *et al.*, 1999).

Atualmente, têm sido realizados diversos estudos com anticorpos monoclonais (MAbs) específicos para as proteínas S, M e N para a detecção e classificação das amostras do VBIg (NAQI *et al.*, 1993; IGNJATOVIC & ASHTON, 1996; MOVING *et al.*, 1998). Para a classificação de isolados, tais procedimentos requerem a existência de MAbs para cada amostra viral, sendo, desse modo, necessária a produção de amplo painel de MAbs

para aumentar a confiabilidade do teste, já que cada MAb reconhece somente um determinante antigênico (IGNJATOVIC & MCWATERS, 1991).

Técnicas moleculares que analisam o genoma viral têm aumentado consideravelmente a habilidade para identificar o VBIg e rapidamente determinam o genótipo/sorotipo do vírus (JACKWOOD, 1997).

O desenvolvimento de técnicas cada vez mais sofisticadas nos capacita a definir sorotipos do VBIg mais facilmente e com maior exatidão e a introdução das técnicas moleculares está aumentando a nossa compreensão da estrutura molecular do vírus, ainda que o VBIg continue a ser problema mundial.

Nos últimos anos, RFLP e seqüenciamento têm-se mostrado como métodos mais sensíveis e específicos para a identificação de amostras do VBIg (BROWN *et al.*, 1984; BINNS *et al.*, 1985; BOURSNEILL *et al.*, 1987; LIN *et al.*, 1991; CAVANAGH & DAVIS, 1992; WILLIAMS *et al.*, 1992; KWON *et al.*, 1993; WANG & TSAI, 1996; JACKWOOD *et al.*, 1997).

Embora o teste de VN em ovos ou em TOC seja o teste definitivo na determinação dos sorotipos de isolados do VBIg, este teste é demorado e laborioso. Para a rápida classificação de amostras do VBIg, pesquisas relacionadas à biotecnologia têm sido desenvolvidas para a tipificação dos isolados de VBIg (KWON *et al.*, 1993). RT-PCR é usada para amplificar o gene codificador da glicoproteína S1 do VBIg e a análise por RFLP é utilizada para identificar os sorotipos do vírus. Uma vez que a glicoproteína S1 contém epitopos sorotipo-específicos, o gene S1 que codifica a glicoproteína S1 é diferente em cada sorotipo do VBIg. Além disso, as diferenças do gene S1 do VBIg podem ser facilmente analisadas por RFLP (SONG *et al.*, 1998).

A aplicação da técnica de PCR, aliada à análise com enzimas de restrição do gene que codifica a proteína S1, é mais rápida para o diagnóstico e permite, ao mesmo tempo, determinar variações moleculares entre diferentes amostras isoladas do VBIg. A observação de direta correlação da análise de restrição com os resultados de testes de neutralização cruzada faz com que este diagnóstico, molecularmente, constitua ferramenta ágil e aplicável ao diagnóstico e

epidemiologia de diferentes sorotipos ou variantes do VBI (KWON *et al.*, 1993). Outras técnicas de diagnóstico do VBI por PCR utilizam também a detecção dos genes que codificam as proteínas internas do vírus, tais como o gene da proteína N do nucleocapsídeo viral, que apresenta maior grau de conservação na sua seqüência entre diferentes amostras do vírus (FALCONE *et al.*, 1997) e o gene da proteína M, que é a proteína integral da membrana (ANDREASEN *et al.*, 1991), mas não permitem a avaliação de variações entre amostras do vírus como detectáveis em S1, nem correlação destas com sorotipos.

2.10.1 Polimorfismo nos comprimentos dos fragmentos obtidos com o uso de enzimas de restrição (RFLP)

Por RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) entende-se, em tradução livre do termo, o polimorfismo no comprimento de fragmentos obtidos por corte da fita dupla de DNA. Tal polimorfismo é evidenciado pela fragmentação diferenciada do DNA com uso de diferentes enzimas de restrição. Para que polimorfismo seja detectado, é necessário que as seqüências de nucleotídeos nas fitas de DNA de dois ou mais indivíduos comparados sejam distintas. Como a diferença em seqüência de nucleotídeos ao longo da fita de DNA de indivíduos distintos é potencialmente enorme, a detecção destas diferenças abre perspectivas relevantes ao estudo do genoma, naturalmente com implicações em diversas áreas de genética.

A técnica de RFLP tem sido utilizada nas análises comparativas, seja em filogenia ou mesmo com fim de diagnóstico. Esta técnica baseia-se na digestão do material genético por enzimas de restrição que reconheçam regiões ou sítios específicos ao longo do DNA. Estes sítios são seqüências de poucos pares de bases (pb). Ao ser submetido à clivagem com enzima de restrição, o DNA de indivíduos geneticamente distintos é cortado nos sítios de restrição, gerando fragmentos de diferentes tamanhos. A presença ou ausência de seqüências específicas de bases, reconhecidas e clivadas pelas enzimas de restrição, pode variar entre diferentes indivíduos, gerando polimorfismos. A idéia serviu para inspirar outros pesquisadores a proporem a utilização da técnica em análise

genômica alguns anos mais tarde (BOTSTEIN *et al.*, 1980; WYMAN & WHITE, 1980). Em pouco tempo, a técnica de RFLP tornou-se ferramenta útil e importante em várias áreas de biologia e tem sido utilizada com eficácia para aprofundar o conhecimento de diferentes fenômenos biológicos. A análise de fragmentos de restrição revela polimorfismo na seqüência de DNA permitindo estudar processos e fenômenos biológicos os mais diversos. A técnica de RFLP é hoje empregada em estudos de diversidade genética, construção de mapas genéticos, estudos filogenéticos e em vários outros aspectos de genética e melhoramento. A técnica de RFLP é proposta a ser utilizada na caracterização genética de organismos, com maior precisão, posto que o DNA marcado representa somente a variação genética e não está sujeito a influências ambientais. A comparação de fragmentos de DNA baseada na homologia de seqüência, característica básica de RFLP, qualifica a técnica para emprego em experimentos fundamentados nesta premissa, como mapeamento genético comparativo e, hoje, é amplamente utilizada.

O polimorfismo observado na técnica de RFLP ocorre porque o DNA de indivíduos geneticamente distintos difere na seqüência de nucleotídeos ao longo da fita. A presença ou ausência de seqüências específicas de 4 a 8 pb, reconhecidas e clivadas pelas enzimas de restrição, pode variar entre diferentes indivíduos, gerando polimorfismo. Diferenças na seqüência de DNA dos indivíduos podem também resultar de inserções, deleções ou outros rearranjos (translocações, inversões) que alterem a distância entre pares de sítios de restrição. Ao ser submetido à clivagem com enzima de restrição, o DNA de indivíduos geneticamente distintos é cortado nos sítios de restrição, gerando fragmentos de diferentes tamanhos. A base genética do polimorfismo observado resulta assim de mutações nos sítios de restrição ou de inserções, deleções e rearranjos entre estes sítios.

O uso da técnica de RFLP visa detectar diferenças nas seqüências de DNA. Uma maneira de se fazer isto é seqüenciar os segmentos de DNA a serem analisados e comparar as seqüências obtidas. No entanto, na prática tal procedimento apresenta, ainda, limitações de várias ordens. Estratégia simples e relativamente rápida de se demonstrar diferenças nas seqüências de DNA é fazer uso da técnica de

RFLP. Após a extração, o DNA é tratado com enzima de restrição, que corta em grande número de pontos (sítios de restrição), gerando enorme quantidade de fragmentos. As diferenças nas seqüências de DNA resultam na clivagem de fragmentos de tamanhos distintos, que são separados por eletroforese em gel de agarose.

LIN *et al.* (1991a) utilizaram a RT-PCR/RFLP para agrupar isolados do VBIG. Foram amplificadas 400 bases da região amino-terminal da glicoproteína S2 e 12 amostras do VBIG foram classificadas em cinco diferentes grupos. O método requereu nove enzimas de restrição e a utilidade desta análise foi verificada com isolados de campo. No mesmo ano, LIN *et al.* (1991 b), utilizando os mesmos procedimentos utilizados anteriormente, tentaram caracterizar quatro isolados do VBIG responsáveis por nefrite em galinhas em diferentes áreas endêmicas do Japão entre 1988 e 1989. Os resultados obtidos indicaram que os isolados (4/4) foram semelhantes entre si, porém diferentes dos isolados classificados anteriormente (LIN *et al.*, 1991 a), sendo agrupados em novo sorotipo/genotipo.

Dois anos mais tarde, KWON *et al.* (1993), utilizando a RT-PCR/RFLP, desenvolveram novo método de identificação de sorotipos/genotipos de isolados do VBIG obtendo resultados concordantes com a classificação sorológica vigente do VBIG. Utilizando três diferentes enzimas de restrição (*Bst*YI, *Hae*III e *Xcm*I), estes pesquisadores agruparam 11 amostras de referência do VBIG em sete sorotipos de acordo com os padrões de polimorfismo dos comprimentos dos fragmentos de restrição obtidos utilizando o gene S1. As amostras Holte, Arkansas DPI, SE17, Md 27 e Iowa 97 puderam ser diferenciadas de outras amostras do vírus utilizando a enzima de restrição *Hae*III. As amostras Beaudette, Mass 41, Connecticut e Florida 88 tiveram o mesmo padrão de polimorfismo usando a enzima *Hae*III, porém puderam ser diferenciadas usando as enzimas de restrição *Xcm*I (Beaudette) e *Bst*YI (Connecticut e Florida). As amostras Gray e JMK não puderam ser diferenciadas por seus padrões de polimorfismo, mesmo após a digestão com 23 enzimas de restrição.

Com o objetivo de determinar o sorotipo de isolados de VBIG pelo polimorfismo do gene S1,

SILVEIRA & MARQUES (1995) trabalharam com oito isolados provenientes do sul do Brasil, previamente caracterizados como VBIG pela patogenicidade a embriões de galinhas. Os padrões de digestão obtidos permitiram classificar dois isolados como pertencentes ao sorotipo Massachusetts, três como variantes e em dois isolados não foi possível amplificar o gene codificador de S1. Um dos isolados foi negativo nas reações de RT-PCR para S1 e nucleocapsídeo e, portanto, não pode ser classificado como VBIG.

Utilizando as mesmas técnicas desenvolvidas por KWON *et al.* (1993), WANG & TSAI (1996) verificaram que, dos 25 isolados de VBIG de Taiwan, somente um foi semelhante à amostra vacinal H120. Os 24 restantes foram diferentes das quatro amostras de referência utilizadas (H120, Conn, JMK e Holte) e de outras 18 amostras cujas seqüências estão depositadas em bancos de genes. Os dados obtidos por RT-PCR/RFLP e seqüenciamento mostraram que os isolados puderam ser divididos em dois grupos distintos, I e II. Sete padrões de restrição foram identificados no grupo I e somente I no grupo II.

As ampliações do gene S1 de sete diferentes isolados de VBIG também foram obtidas por WANG *et al.* (1996), os produtos amplificados mostraram ter tamanho aproximado de 1745 pb. Os perfis de RFLP obtidos foram bem diferentes dos relatados por KWON *et al.* (1993). Nenhum sítio de restrição foi encontrado pela enzima *Bst*YI em todos os isolados do estudo. Somente um dos isolados foi digerido pela enzima *Xcm*I em dois fragmentos (aproximadamente 1445 e 300 pb), sendo observado, também, digestão incompleta do produto de PCR.

Para caracterizar molecularmente um isolado (CT/7852/97) proveniente de um plantel de poedeiras comerciais apresentando queda de postura e diminuição da qualidade dos ovos, Wang & Khan (2000) utilizaram tanto a RT-PCR associada ao RFLP quanto a PCR multiplex. Os resultados mostraram consistentemente que o isolado pertencia ao sorotipo Massachusetts.

Dez isolados de VBIG oriundos de frangos de corte no México foram estudados por ESCORCIA *et al.* (2000). Os isolados foram provenientes de traquéias, pulmões, rins e tonsilas cecais de aves que apresentavam sinais respiratórios, apesar da

vacinação com as amostras Massachusetts e Connecticut. Seis dos isolados foram neutralizados por anticorpos monoclonais contra o sorotipo Massachusetts, sendo que os outros quatro não. Além disso, esses quatro isolados não produziram lesões em embriões nas primeiras cinco passagens das sete realizadas. Esses quatro isolados foram, mais tarde, caracterizados por RT-PCR/RFLP. Os perfis de restrição dos quatro isolados foram idênticos entre si, porém diferentes de outros isolados de VBIG conhecidos.

A técnica RT-PCR/RFLP é mais sensível que técnicas sorológicas para o estudo da diversidade genética e é ferramenta bastante útil para estudos epidemiológicos de doenças infecciosas (PURCHASE, 1989).

2.11 Seqüenciamento de DNA

O seqüenciamento e subsequente comparação de seqüências nucleotídicas e/ou de aminoácidos de proteínas virais é instrumento muito útil para auxiliar a localização de domínios conservados nas proteínas, sendo essenciais para a sua estrutura e função e para estudos epidemiológicos.

O seqüenciamento do VBIG pode ser realizado em qualquer região do genoma, mas, geralmente, é realizado em parte selecionada do gene da proteína S (BINNS *et al.*, 1985, 1986; NIESTERS *et al.*, 1986; CAVANAGH *et al.*, 1988, 1992, 1997, 1998, 1999; KUSTERS *et al.*, 1990; WANG *et al.*, 1994; WANG & TSAI, 1996), no gene M (BOURSNELL *et al.*, 1984; CAVANAGH & DAVIS, 1988, 1992) e no gene N (ZWAAGSTRA *et al.*, 1992; WILLIAMS *et al.*, 1992). Baseados nos dados da seqüência, pode-se construir a árvore filogenética, revelando as similaridades genômicas entre diferentes amostras. Entretanto, deve ser lembrado que o local que certa amostra ocupa na árvore filogenética pode diferir, dependendo das técnicas utilizadas (KUSTERS *et al.*, 1989; ZWAAGSTRA *et al.*, 1992) ou qual parte do genoma é analisada (KUSTERS *et al.*, 1990; ZWAAGSTRA *et al.*, 1992). Dados de seqüenciamento somente fornecem informação sobre a estrutura primária (seqüência de aminoácidos) da proteína. Diferenças detectadas nas seqüências de duas amostras não podem ser traduzidas como diferenças na antigenicidade ou

função biológica, uma vez que as estruturas secundária e terciária da proteína, que são muito importantes na função biológica e antigenicidade, permanecem desconhecidas.

Os genes escolhidos como indicadores de similaridades devem preencher dois requisitos. Por um lado, devem possuir função conservada para que a similaridade entre eles seja testada. Por outro, alguns segmentos destes genes devem evoluir rapidamente entre amostras relacionadas para distinguir entre variantes (BOURHY *et al.*, 1995). Em vírus, genes codificadores tanto para proteínas internas quanto externas têm sido utilizados.

Os genes S das amostras Beaudette e M41 do VBIG foram os primeiros a serem clonados e seqüenciados (BINNS *et al.*, 1985, 1986; NIESTERS *et al.*, 1986) e mostraram codificar uma proteína de 1165 aminoácidos, dos quais os primeiros 18 formam a seqüência sinalizadora amino-terminal. Diferenças entre M41 e Beaudette foram de 22% para S1 e 7% em S2. A comparação entre diferentes amostras do VBIG revelou que a seqüência de aminoácidos de S1 oscilava de pequena (3,7% comparadas M41 e Beaudette) a grande variação (44 e 48%), quando comparadas respectivamente M41 e UK6/82 com o sorotipo holandês D1466 (KUSTERS *et al.*, 1989).

Embora os genes individuais (a maioria da proteína S) de muitos isolados do VBIG têm sido seqüenciados (BINNS *et al.*, 1985; 1986a, b; BOURSNELL *et al.*, 1985; CAVANAGH & DAVIS, 1988, 1992; WANG *et al.*, 1993; JIA *et al.*, 1995), a seqüência completa até a terminação 3' do genoma (genoma completo exceto o gene da RNA polimerase) de somente uma amostra (Beaudette) do sorotipo Massachusetts e uma amostra japonesa (KB8523) foram determinadas até então (BOURSNELL *et al.*, 1987; SUTOU *et al.*, 1988).

Existem muitos dados seqüenciais para número de diferentes linhagens de VBIG, principalmente para o gene S (BINNS *et al.*, 1985; 1986; NIESTERS *et al.*, 1986; CAVANAGH *et al.*, 1992). Estes dados revelam que existem diferenças acentuadas na seqüência do gene S de diferentes sorotipos do VBIG e que estas diferenças, ao invés de estarem dispersas casualmente por todo o gene, tendem a ocorrer em duas áreas

principais, chamadas regiões hipervariáveis. Podem existir apenas algumas poucas diferenças na seqüência de aminoácidos nas amostras do VBIG pertencentes a sorotipos diferentes. Entretanto, se estas mudanças ocorrem nestas regiões hipervariáveis, elas provavelmente resultam no que é definido, por testes sorológicos, como novo sorotipo. O primeiro terço do gene S1 contém regiões hipervariáveis que têm sido relacionadas com o sorotipo. Sendo assim, a seqüência nucleotídica do gene S1 naquela área pode ser usada para agrupar o vírus pelo genótipo que se relaciona ao sorotipo (JACKWOOD, 1997). Deste modo, diferenças sutis na composição do gene S criam novo sorotipo. Parece provável que estas partículas virais com estrutura S1 diferente terão vantagem seletiva e serão mais capazes de infectar galinhas que já tenham sido expostas a outras amostras do VBIG (COOK, 1998).

Quando seqüências de aminoácidos da proteína S1 são arbitrariamente divididas em quatro regiões de aproximadamente 130 resíduos de aminoácidos, as comparações entre isolados de seqüências de S1 diferentes têm mostrado que a primeira região, compreendendo a porção amino-terminal, contém diferenças mais substanciais que qualquer outra região (CAVANAGH & DAVIS, 1992). Situação semelhante também foi observada em relação à amostra B1648 (SHAW *et al.*, 1996).

Amostras do sorotipo Connecticut são estreitamente relacionadas às amostras Massachusetts em termos de seqüência nucleotídica do gene S1 (HANDBERG *et al.*, 1999).

Regiões específicas de variabilidade, bem como relações filogenéticas de amostras do VBIG, têm sido identificadas pelas análises de seqüências nucleotídicas (CAVANAGH *et al.*, 1988; KUSTERS *et al.*, 1989). O seqüenciamento do glicopoli-peptídeo S (S1 + S2) revelou que as diferenças entre os isolados do VBIG concentram-se em duas regiões da subunidade S1 e muito pouca variação na seqüência de aminoácidos na subunidade S2 (BINNS *et al.*, 1986; CAVANAGH *et al.*, 1986; NIESTERS *et al.*, 1986). Entretanto, variações na subunidade S2 podem ter reflexos diretos na estrutura espacial da glicoproteína S1 a exemplo do que é

verificado por anticorpos monoclonais epitopos S1 específicos (CALLISSON *et al.*, 1999).

Amostras variantes do VBIG continuam surgindo constantemente e essas variantes podem circular entre os plantéis avícolas em áreas isoladas geograficamente (MOORE *et al.*, 1998).

2.12 Controle

A prevenção e o controle da BIG dependem de muitos fatores, por exemplo: práticas de manejo das aves, identificação dos sorotipos prevalentes na região, determinação da proteção cruzada das vacinas disponíveis e dos isolados de campo, estabelecimento de eficiente programa de vacinação contra a BIG e controle de outros fatores imunodepressores.

As práticas de manejo são parte fundamental na prevenção da doença. O ideal é manter estreito isolamento das granjas, adotar o método de criação "all in - all out" (tudo dentro, tudo fora), lotes próximos devem possuir idade única, lavar e desinfetar as instalações depois da retirada de cada lote, implantar rigoroso controle de biossegurança na granja e evitar o contato das aves com a fauna silvestre. Em geral, se as práticas de manejo não são adequadas, torna-se mais difícil o controle da enfermidade.

Muito embora o bom manejo desempenhe papel importante no controle de infecções da BIG, o controle adequado não é possível sem uso de vacinas. Isto porque o VBIG é muito infeccioso, espalha-se muito rapidamente e pode persistir na galinha por várias semanas.

A identificação dos sorotipos envolvidos em surtos da doença em determinada região é passo muito importante para o controle da BIG.

Desde a sua identificação inicial, há quase 70 anos atrás, o VBIG tem sido problema constante nos plantéis avícolas de todo o mundo. Tentativas para controlar a doença causada por este vírus têm sido frustradas pela natureza biológica dos coronavírus. Devido ao seu tamanho e composição molecular, o VBIG possui a tendência a formar novas amostras variantes que, aparentemente, não são inibidas pela imunidade gerada por vacinas comerciais (GELB, 1991). Torna-se necessário determinar a

prevalência de amostras de VBIG que são semelhantes ou diferentes das amostras vacinais utilizadas. Os programas destinados ao controle do VBIG por imunização dependem do uso de vacinas que são antigênicamente semelhantes às amostras de campo circulantes; neste caso, são dependentes da caracterização de novos isolados de VBIG (KING, 1988).

Os primeiros isolados do VBIG foram apontados como sendo do sorotipo Massachusetts (Mass) e amostras deste sorotipo foram as primeiras a serem utilizadas na produção de vacinas vivas. As amostras H120 e H52 do VBIG representam diferentes níveis de passagens embrionárias e de graus de atenuação da amostra Holland, têm sido utilizadas extensivamente por décadas (KING & CAVANAGH, 1991). Apesar da disponibilidade de boas vacinas para controlar a doença, a BIG continua a ser um dos principais problemas de doença em todas as áreas onde existe indústria avícola desenvolvida (WANG & HUANG, 2000). A infecção com isolados de campo não é prevenida pelas vacinas disponíveis, devido às diferenças entre sorotipos (WANG *et al.*, 1996).

Existem muitos sorotipos do VBIG, basicamente definidos por testes de neutralização cruzada (CAVANAGH & NAQI, 1997). Os diferentes sorotipos, algumas vezes, causam "quebras vacinais", porque a vacinação com determinado sorotipo não oferece proteção completa contra sorotipos heterólogos (Hofstad, 1981; JACKWOOD *et al.*, 1997).

Os isolamentos de diferentes sorotipos de VBIG ratificam a sugestão de COOK (1984) de que o VBIG pode, gradualmente, alterar suas características antigênicas e confirma a necessidade de se continuar o levantamento da situação do VBIG. Uma vez que a imunidade contra o VBIG é sorotipo-específica, falhas

vacinais são freqüentemente associadas ao surgimento de variantes antigênicas diferentes dos vírus vacinais. Além disso, o perfeito entendimento de epitopos sorotipo-específicos da proteína S é requerido para o desenvolvimento de estratégias para melhorar as vacinas utilizadas atualmente (JIA *et al.*, 1995).

As vacinas permitidas para aplicação no Brasil são do sorotipo Massachusetts, H-120, H-90, H-52 (atenuadas por passagens em OEG/SPF) e MA-5 (atenuada e clonada), embora exista evidência da necessidade de introduzirem-se vacinas de sorotipos variantes (MARTINS, 1992).

A decisão de se vacinar frangos de corte deve ser tomada não apenas levando em conta a empresa ou empresas afetadas, mas, principalmente, a região ou regiões afetadas. É fundamental levar em conta alguns fatores tais como a avaliação técnica do problema quanto ao comprometimento dos lotes afetados, número de lotes afetados dentro da região, presença de sinais clínicos, lesões macro e microscópicas. Depois de tomada a decisão de se vacinar, acredita-se que a vacinação no primeiro dia de idade via *spray* (gota grossa) seja a maneira mais eficiente de controle e proteção das aves (DI FÁBIO, 1993).

Para controle mais eficiente da BIG, estudos constantes deveriam ser conduzidos para verificar se as vacinas convencionais podem proteger galinhas contra a doença causada por sorotipos variantes do VBIG recentemente isolados com base no isolamento periódico e identificação dos isolados de campo. Em resumo, o controle da BIG deve ser processo ativo e contínuo, devido à recorrência dos problemas respiratórios nas aves.

3 ESTUDOS EXPERIMENTAIS

3.1 Detecção de Isolados do Vírus da Bronquite Infecciosa das Galinhas Utilizando a Transcrição Reversa – Reação em Cadeia pela Polimerase (RT-PCR) do Gene Codificador da Glicoproteína S1

3.1.1 Introdução

A biologia molecular ocupa cada vez mais espaço, não apenas em pesquisa, mas também em áreas aplicadas como no diagnóstico de doenças de aves. A pesquisa em biologia molecular tem gerado conhecimento, métodos e ferramentas em microbiologia, que têm encontrado larga aplicação no campo clínico, terapêutico e de diagnóstico. Os exemplos são vários, como no diagnóstico e na epidemiologia de doenças infecciosas. Nesses casos, pela identificação de patógenos via métodos de detecção direta de seus genomas, ou ainda, pela caracterização molecular para definir aspectos da evolução.

A técnica da reação em cadeia pela polimerase (PCR – *Polymerase Chain Reaction*) tem se mostrado método rápido e sensível para o diagnóstico de doenças virais. A alta sensibilidade e especificidade características da técnica fazem que ela seja utilizada para a detecção de bactérias e vírus e tenha sido amplamente aplicada desde a sua introdução. A PCR rapidamente tornou-se ferramenta básica da pesquisa em biologia molecular, facilitando o isolamento e identificação de genes.

Atualmente, é técnica que vem cada vez mais ocupando espaço no diagnóstico de doenças de aves, inclusive no Brasil, para a detecção, por exemplo, de microrganismos associados a importantes doenças de impacto econômico na avicultura.

O uso da transcrição reversa (RT – *Reverse Transcription*) /PCR (RT-PCR) para o diagnóstico de vírus RNA começou como

conseqüência da expansão de técnicas de biologia molecular e do crescente conhecimento sobre o genoma destes vírus. A RT-PCR tem sido utilizada com sucesso para a detecção de muitos vírus RNA, inclusive para o VBIg.

Problema relacionado à BIG são os atuais métodos de diagnóstico utilizados. Além de laboriosos e demorados, estes testes apresentam resultados inconclusivos devido às reações cruzadas e omissão de novas amostras, dificultando a realização de estudos epidemiológicos sobre a doença, como também e, principalmente, o seu controle. Por outro lado, o diagnóstico tem sido realizado com sucesso pela RT-PCR para várias regiões genômicas do vírus com diversos graus de variação entre amostras do VBIg (KOCH *et al.*, 1990; Kwon *et al.*, 1993; WANG & TSAI, 1996).

Além dos importantes aspectos epidemiológicos do VBIg, que podem ser avaliados por RT-PCR, esta técnica tem inúmeras vantagens de diagnóstico por ser rápida e específica.

Desse modo, este estudo teve como objetivo amplificar, utilizando a RT-PCR, o gene codificador da glicoproteína S1 de alguns isolados do VBIg oriundos de diferentes regiões de Minas Gerais, Brasil.

3.1.2 Material e métodos

Local

Este estudo foi realizado nos Laboratórios do Setor de Doenças das Aves do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais – DMVP/EV/UFMG. Algumas atividades foram desenvolvidas no Laboratório de Virologia Comparada (LVC) do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

Amostras virais

Amostras de referência foram utilizadas para comparação com os isolados de campo. Foram utilizadas nove amostras de referência do VBI (oito americanas e uma européia) compreendendo oito diferentes sorotipos (Tabela 2) e 15 isolados do VBI (Tabela 3) oriundos de surtos da doença clínica em plantéis vacinados e não vacinados, na avicultura industrial do Estado de Minas Gerais (Zonas Metalúrgica e Alto São Francisco). As amostras de referência Massachusetts – M41 (ATCC VR-21), Connecticut – A5968 (ATCC VR-817) e

Arkansas 99 (ATCC VR-841) foram obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC) (Rockville, MD, EUA) e importadas vivas liofilizadas com autorização do Ministério da Agricultura. A UK 6/82 foi gentilmente cedida pela Dra. Jane Kathleen Alexandra Cook do acervo do *Institute for Animal Health* (IAH) (Houghton/Reino Unido) em 1990 e foi recebida previamente inativada pelo calor (56°C/30 min) semelhantemente às amostras provenientes da SPAFAS/EUA (JMK, SE-17, Iowa 609 e Iowa 97). A amostra H-52 foi obtida do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) e importada liofilizada na 51ª passagem.

Tabela 2 – Amostras de referência do vírus da bronquite infecciosa das galinhas (VBI)

Amostra	Sorotipo ¹	Passagens em OEG/SPF ²	Procedência
M41	Massachusetts	8	ATCC ³ /EUA
H-52	Massachusetts	52	USDA ⁴ /EUA
A5968	Connecticut	10	ATCC/EUA
JMK ⁵	JMK	15	SPAFAS ⁶ /EUA
SE-17 ⁵	SE-17	16	SPAFAS/EUA
Ark-99	Arkansas	7	ATCC/EUA
Iowa 609 ⁵	I-609	10	SPAFAS/EUA
Iowa 97 ⁵	I-97	9	SPAFAS/EUA
UK 6/82 ⁵	UK 6/82	5	<i>Institute for Animal Health</i> (IAH)/ Houghton/Reino Unido

¹ Denominação de acordo com KWON *et al.* (1993).

² O número de passagens em ovos embrionados de galinhas SPF com 9-10 dias de incubação a 37°C corresponde às passagens realizadas no laboratório de origem e todas as realizadas no Setor de Doenças das Aves do DMVP/EV/UFMG, inclusive a necessária para este estudo.

³ *American Type Culture Collection* (ATCC), 112301 – Parklawn Drive, Rockville, MD-EUA, 20852.

⁴ USDA (Departamento de Agricultura dos Estados Unidos da América).

⁵ Importada inativada pelo calor (56°C/30 min).

⁶ SPAFAS, Norwich, CT-USA, 06360 – 1301.

Dos 15 isolados virais, 14 foram provenientes de frangos de corte sendo que 4/14 exibiram alterações renais (síndrome nefrite-nefrose). Apenas uma amostra (208) foi proveniente de poedeiras comerciais que apresentaram problemas reprodutivos (queda de postura e produção de ovos anormais) e respiratórios. Esta amostra foi gentilmente cedida pelo Prof. Maurício Resende do Laboratório de Virologia Comparada do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG tendo sido isolada em 1972, a partir de swabs traqueais de poedeiras comerciais adultas apresentando sinais respiratórios tais como: espirros, dispnéia, ronqueira.

As outras 14 amostras foram isoladas e caracterizadas no Laboratório de Doenças das Aves do DMVP/EV/UFMG pelos Profs. Regino Leonardo de Oliveira (TII, G e 29-78) e José Sérgio de Resende (demais amostras). Os isolamentos destas amostras foram realizados em OEG/SPF de acordo com a técnica descrita por LUKERT (1975). No mínimo duas passagens consecutivas foram necessárias para o isolamento das amostras.

Tabela 3 – Isolados do vírus da bronquite infecciosa das galinhas (VBIG) provenientes de surtos da doença na avicultura industrial no Estado de Minas Gerais, no período compreendido entre 1972 e 1989

Isolado	Número de passagens em OEG/SPF ¹	Ano de isolamento	Tipo de criação ²	Quadro clínico no surto de origem ³
208	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

¹ O número de passagens em ovos embrionados de galinhas SPF com 9-10 dias de incubação a 37°C corresponde às passagens realizadas no laboratório de origem e todas as realizadas no Setor de Doenças da Aves do DMVP/EV/UFMG, inclusive a necessária para este estudo.

² P – Poedeira; FC – Frango de corte

³ R – Respiratório; QP – Queda de postura; POA – Postura de ovos anormais; SNN – Síndrome nefrite nefrose

Estas amostras foram caracterizadas como VBIG com base nas seguintes provas: comportamento em OEG/SPF em que foram observadas as presenças de nanismo, enrolamento, formação de uratos nos mesonefros e hepatite hemorrágica; ausência de neutralização com soros imunes de referência (SPAFAS/EUA) antivírus da doença de Newcastle e anti-aviadenovírus grupo I sorotipo 1; ausência de atividade hemaglutinante dos líquidos alantoidianos frente a hemácias de galinhas SPF; hemaglutinação após tratamento com fosfolipase C tipo I (PANIAGO, 1994); neutralização em cultivos de anéis de traquéia (EPIPHANIO, 1998); ELISA com anticorpos monoclonais contra S1 (SOUZA, 1999); RT-PCR de parte do gene S2 (Resende *et al.*, 1998) e RT-PCR de parte do gene N (ABREU, 2000).

As amostras adquiridas vivas utilizadas neste estudo estão armazenadas, em alíquotas, em botijão de nitrogênio líquido (-196°C), para evitar a necessidade de passagens seriadas em OEG/SPF, o que pode ocasionar alterações

irreversíveis na sua antigenicidade e patogenicidade (CAVANAGH & NAQI, 1997). As amostras adquiridas inativadas estão alíquotadas e criopreservadas.

Replicação e concentração virais

A replicação das amostras virais foi realizada de acordo com JACKWOOD *et al.* (1992) com algumas modificações. As amostras de referência adquiridas vivas (M41, A5968 e Ark-99) e todos os isolados virais (15/15) foram replicados.

Cada vírus estoque foi previamente diluído 10⁻³ em PBS (pH 7,4) autoclavado, para conter aproximadamente 10² DIE₅₀ (dose capaz de infectar 50% dos embriões dos OEG/SPF)/0,1 mL. Posteriormente, foi adicionada solução filtrada (filtro descartável 0,22 µm – Swinnex Millipore, EUA) de antibióticos de forma a obter-se concentração final de 14,5 mg/mL de sulfato de gentamicina, 0,72 mg/mL de

estreptomicina e 700 UI/mL de penicilina G potássica.

Estas suspensões virais foram inoculadas, via cavidade corio-alantoidiana, em OEG/SPF (0,1 mL/ovo), em cabine de fluxo laminar, previamente desinfetada, utilizando 15 ovos férteis com dez dias de incubação por amostra. Os OEG/SPF inoculados foram incubados por um período de 48 a 72 h a 37°C a 80% de umidade. A ovoscopia foi realizada diariamente e os OEG/SPF com embriões mortos até 24 h após a inoculação (hai) foram descartados em balde contendo formol a 10%, por serem estas mortes consideradas como provenientes de causas inespecíficas. Decorridas 48-72 hai, dois OEG/SPF de cada amostra, incluindo os controles, foram mantidos na incubadora até 216 hai, para a avaliação da presença ou ausência de lesões características de VBIG, sendo os demais embriões vivos resfriados a 4°C por 16 h. Para cada amostra de VBIG, foi obtido um *pool* de líquidos alantoidianos (LA) em frasco estéril, coletados em banho de gelo, dentro de cabine de fluxo laminar, após a desinfecção da casca do ovo com solução de álcool iodado a 3%. De cada *pool* resultante foi retirada uma alíquota para a verificação da atividade hemaglutinante frente a uma suspensão de eritrócitos (5%) de galinhas SPF. O restante do *pool* de LA permaneceu em repouso (24h/4°C) para a decantação de hemácias e resíduos celulares. As amostras virais foram concentradas em membranas de diálise (Spectrapor™, 45 mm de ϕ , Spectrum Medical Industries, EUA) previamente lavadas com detergente (Extran, Merck) e fervidas durante 10 min. As membranas de diálise contendo o LA rico em VBIG foram imersas em recipiente contendo solução concentrada (50%) de polivinilpirrolidona (PVP 360, Sigma, EUA) previamente autoclavada e resfriada, sendo posteriormente mantidas em geladeira (4°C) por 24 a 48 h ou até a completa desidratação do material.

Os materiais desidratados retidos nas membranas de diálise foram ressuspensos 1:1.000 em PBS (pH 7,4) autoclavado, colocados em criotubos (~2 mL/criotubo) e mantidos em nitrogênio líquido até o momento de serem utilizados para a extração do RNA.

Extração do RNA

As extrações de RNA foram realizadas a partir das suspensões virais obtidas, de acordo com a técnica descrita por Adzhar *et al.* (1996) e com o manual de instruções do kit SUPERSRIPT™ (*Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis* CAT. NO. 18089-011/GIBCO BRL/Life Technologies, EUA), com modificações. Para cada uma das nove amostras de referência e quinze isolados do VBIG estudados, foi realizada a extração do RNA, utilizando-se o seguinte protocolo:

Uma alíquota (2 mL/amostra) de cada amostra foi retirada do nitrogênio líquido, descongelada em água corrente e centrifugada em microcentrifuga (mod. 212 centimicro, rotor ângulo fixo, FANEM, Brasil) a 6.000 X g/ 4°C/3 min. Após a centrifugação, parte do sobrenadante (500 μ L) foi transferida para dois microtubos (1.500 μ L, livre de RNase, estéril, marca Eppendorf, Alemanha), colocando-se 250 μ L em cada um, sendo, em seguida, adicionados a cada um deles, 15 μ L de *Ribonucleoside Vanadyl Complexes* (RVC) (Sigma, EUA) como inibidor de endonucleases. Os microtubos foram rapidamente vortexados e centrifugados. Em seguida, adicionou-se 750 μ L de TRIzol LS (BRL, EUA) em cada microtubo, com completa homogeneização por lenta pipetagem e repouso em temperatura ambiente (TA) por 5 min. Durante a homogeneização da amostra, o reagente TRIzol mantém a integridade do RNA enquanto dissolve eventuais componentes celulares presentes e desnatura as proteínas, inclusive as virais. Logo após, foram adicionados 250 μ L de clorofórmio p.a. (Merck, Alemanha) com agitação vigorosa dos microtubos por 15 s, seguida de repouso em TA durante 10 min e centrifugação a 13.000 X g/4°C/15 min. A adição do clorofórmio seguida pela centrifugação separa a solução em uma fase aquosa e outra fase orgânica. O RNA permanece exclusivamente na fase aquosa. Após a centrifugação, a fase superior aquosa foi transferida para um novo microtubo (1.500 μ L) sendo adicionados, então, 500 μ L de isopropanol (livre de RNase, Sigma, EUA). O RNA é removido da fase aquosa pela precipitação com isopropanol. Os microtubos foram homogeneizados levemente por inversão manual e mantidos em repouso em TA durante 10 min. A precipitação do RNA foi realizada por centrifugação a 13.000 X g/4°C/10 min, sendo o sobrenadante desprezado. Rapidamente, foram

adicionados 1.000 µL de solução de etanol a 75% (livre de RNase, Sigma, EUA). Os microtubos foram rapidamente vortexados e centrifugados a 6.500 X g/4°C/5 min O etanol foi desprezado por inversão e os microtubos colocados deitados e abertos sobre a bancada por até 10 min para a evaporação do etanol, tendo-se o cuidado para não deixar o *pellet* secar. Os pellets foram reconstituídos em 20 µL de água ultrapura (livre de RNase), homogeneizando-os com a ponteira em movimentos circulares, passando a chamar-se "solução de RNA". Desta, 10 µL foram transferidos para um novo microtubo (500 µL) para uso imediato na reação de transcrição reversa (RT). A solução restante foi mantida em *freezer* a -20°C.

Oligonucleotídeos (*primers*)

Os oligonucleotídeos (*primers*) utilizados neste estudo (Tabela 4) foram sintetizados pela GIBCO BRL (Life Technologies, EUA) e fornecidos previamente purificados por HPLC (*High Pressure Liquid Chromatography*). O oligonucleotídeo S1OLIGO3' (senso negativo) é a seqüência complementar à terminação 5' do gene codificador da glicoproteína S2 e o oligonucleotídeo NEWS1OLIGO5' (senso positivo) é seqüência idêntica à região 5' do gene codificador da glicoproteína S1. Ambos foram baseados na seqüência completa de nucleotídeos do RNA da amostra Beaudette do VBIG, publicada por BINNS *et al.* (1985), conforme KWON *et al.* (1993) e JACKWOOD *et al.* (1997).

Extração do RNA

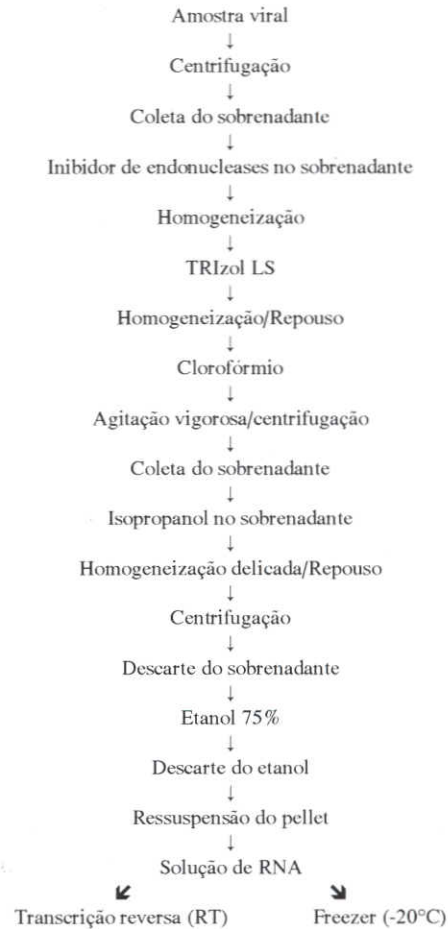


Tabela 4 - Oligonucleotídeos utilizados na amplificação do gene codificador da glicoproteína S1 do vírus da bronquite infecciosa das galinhas (VBIG)

Oligonucleotídeo	Seqüência (5' → 3')	Posição no genoma ¹	Referência Original
S1OLIGO3' (senso negativo)	CATAACTAACATAAGGGCAA ²	22.021 - 22.002	Kwon <i>et al.</i> (1993)
NEWS1OLIGO5' (senso positivo)	TGAAACTGAACAAAAGAC ³	20.302 - 20.319	Jackwood <i>et al.</i> (1997)

¹ Posição em relação à amostra Beaudette (BINNS *et al.*, 1985)

² Seqüência complementar à região 5' do gene codificador da glicoproteína S2

³ Sequência idêntica à região próxima à terminação 5' do gene codificador da glicoproteína S1.

O tamanho da seqüência obtida pela RT-PCR, para a amostra de referência M41, incluindo os dois oligonucleotídeos, é de 1720 pb, o que compreende o gene completo da glicoproteína S1 acrescido da seqüência inicial de S2. A Figura 4 mostra a posição de anelamento dos oligonucleotídeos no genoma do VBIg.

A especificidade das seqüências dos oligonucleotídeos foi inicialmente testada pela

comparação com outras seqüências disponíveis no *GenBank*, utilizando o programa BLASTN (*Basic Local Alignment Search Tool*) desenvolvido pelo National Centre for Biotechnology Information (NCBI) que pode ser obtido no web-site <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>.

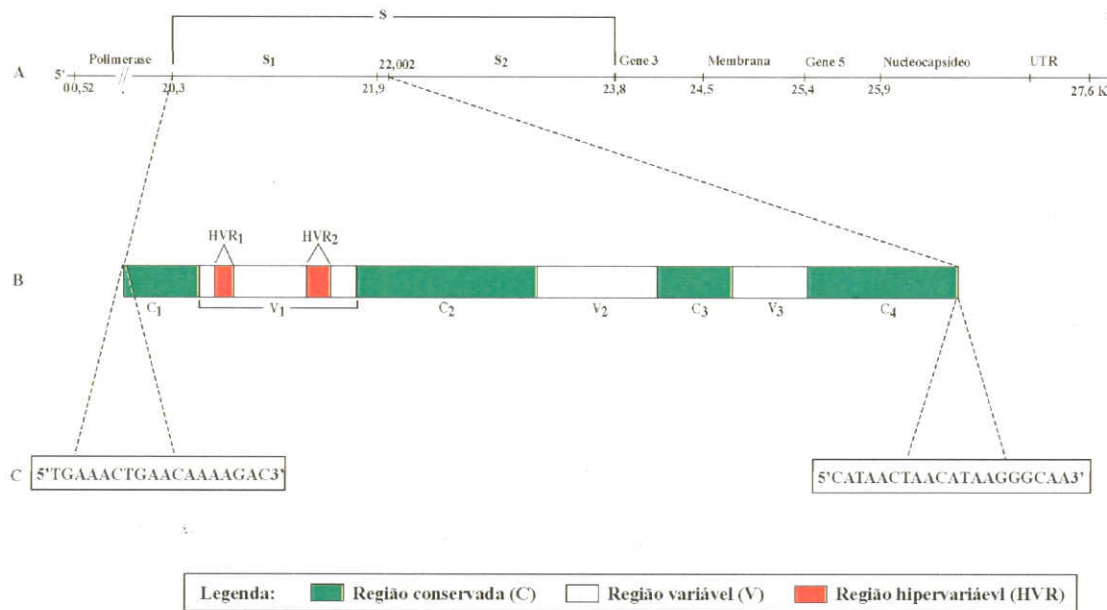


Figura 4 - Posição de anelamento dos oligonucleotídeos no genoma do vírus da bronquite infecciosa das galinhas (VBIg). (A) Representação esquemática da fita senso do RNA do VBIg. O tamanho do genoma (Kb) foi baseado na seqüência completa da amostra Beaudette (BINNS *et al.*, 1985). (B) Gene amplificado pelos oligonucleotídeos NEWS1OLIGO5' (JACKWOOD *et al.*, 1997) e S1OLIGO3' (KWON *et al.*, 1993). (C) Oligonucleotídeos homólogo e complementar. Figura modificada por KEELER JR. *et al.* (1998).

De acordo com recomendações do laboratório sintetizador, os oligonucleotídeos foram diluídos para formar "solução estoque" (100µM) e, a partir desta, a solução de uso (10µM).

Cada oligonucleotídeo foi reconstituído em solução tampão TE [10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA (pH 8,0)] autoclavada, obtendo-se, assim,

"solução estoque" com aproximadamente 100 µM (100 pmol/ µL). Esta solução foi vortexada e

centrifugada rapidamente (6.500 X g/5 s), permanecendo em geladeira (4°C) durante 24 h para a completa dissolução do produto. A partir desta "solução estoque", cada oligonucleotídeo foi novamente diluído, porém em água ultrapura livre de RNase, obtendo-se solução de uso com 10 µM. Para o oligonucleotídeo S1OLIGO3' (senso negativo), além da solução de uso 10 µM, foi preparada, também, uma solução de uso 2 µM para ser utilizada na RT.

As soluções foram aliquotadas em pequenos volumes, permitindo uma única utilização desta

por reação de RT-PCR e descarte do restante. As alíquotas foram mantidas em criotubos (2.000µL) novos e estéreis com tampa rosqueável e anel vedador de borracha, evitando-se, desta maneira, a desidratação das mesmas e foram, em seguida, armazenadas em freezer (-20°C) até o momento de serem utilizadas. As características dos oligonucleotídeos utilizados foram fornecidas pela empresa sintetizadora e podem ser verificadas na Tabela 5.

Tabela 5 – Características dos oligonucleotídeos

Propriedades	S1OLIGO3'	NEWS1OLIGO5'
Seqüência (5'→3')	CAT AAC TAA CAT AAG GGC AA	TGA AAC TGA ACA AAA GAC
Número total de nucleotídeos	20	18
Peso molecular (µg/µmole)	6.450	5.822,6
Coefficiente de extinção milimolar	245,9	229,2
Temperatura de <i>melting</i> (°C)	54	48
%GC	41	33
µg/OD	26,2	25,4
NM/OD	4,0	4,3
OD's	10,9	7,8
µg's	286	198
NM	44	34
Eficiência de acoplamento (%)	98	98
Escala de síntese (nmol)	200	200

Síntese do DNA complementar (cDNA) – Transcrição reversa (RT)

A RT foi realizada utilizando-se o kit SUPERSRIPT™ de acordo com recomendações do fabricante. Um fluxograma do protocolo pode ser visto na Figura 5.

A cada solução de RNA foram adicionados 2 µL do oligonucleotídeo complementar S1OLIGO3' (2 µM). A suspensão foi, então, aquecida a 70°C por 10 min e, logo após, resfriada em gelo por 1 min. Para cada amostra, foram adicionados 8 µL de solução, preparada no momento do uso e mantida em banho de gelo, 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 mix (10 mM de cada dNTP), 2 µL de DTT (0,1 M) e 1 µL de RNasin (4 U/ µL, Promega, EUA), adicionando-se imediatamente 1 µL (200 U/µL) da enzima transcriptase reversa do vírus "Moloney" da leucemia murina (kit SUPERSRIPT II RT RNase H, BRL, EUA). Em seguida, as amostras foram rapidamente vortexadas e centrifugadas a 6.500 X g por 10 s., sendo posteriormente incubadas a 42°C por 90 min. A reação foi interrompida pela inativação da enzima a 70°C por 15 min. Em cada amostra, adicionou-se 1 µL da enzima RNase H⁺ com a finalidade de destruir o RNA residual que, se

presente na solução de cDNA, poderia interferir na PCR. As amostras foram vortexadas e centrifugadas rapidamente sendo posteriormente

incubadas a 37°C por 20 min. As soluções de cDNA foram armazenadas em *freezer* (-20°C) para posterior realização das reações de PCR.

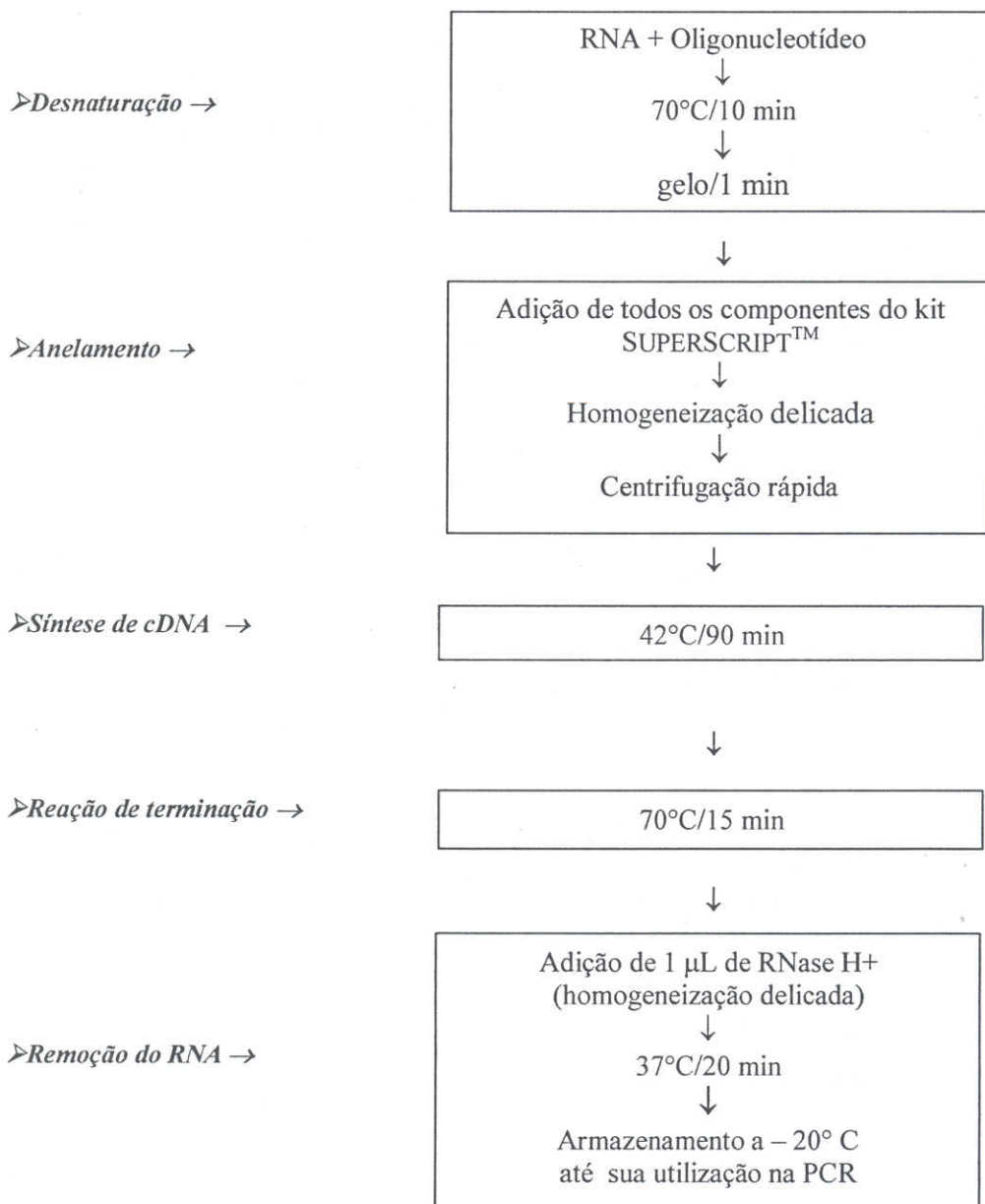


Figura 5 – Fluxograma representativo da transcrição reversa (RT)

PCR

A PCR utilizada foi a descrita por KWON *et al.* (1993) para a amplificação do gene codificador da glicoproteína da espícula – região amino

terminal (S1 – 1,7 Kb), com modificações nas condições da reação. Foram testados vários parâmetros para a obtenção de condições ótimas na amplificação do gene de interesse, sendo estes: concentração de MgCl₂ (1,5 mM → 3,0 mM), concentração dos oligonucleotídeos (0,2 μM → 0,14 μM), concentração da *Taq* DNA polimerase (1% → 0,3%) e concentração do cDNA (2; 1; 0,2 e 0,1%) (Tabela 6). Além disso, foram avaliadas também três possibilidades de combinações de ciclos, permanecendo invariáveis os ciclos iniciais (um ciclo de 94°C – 5 min; um ciclo de 74°C – 6 min) e o final (um ciclo de 74°C – 5 min). Nos ciclos intermediários foram testadas variações nas temperaturas de anelamento (programa denominado FORSEQ) e no número de ciclos (programas NEWBIG e FORSEQ) (Tabela 7). Com as condições ótimas determinadas, as reações de PCR foram conduzidas em microtubos novos, estéreis (500 μL, livre de DNase), em volume final de 50 μL, contendo 33,5 μL de água ultrapura (livre de DNase); 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); 6 μL MgCl₂ (25 mM) (Promega, EUA); 1 μL dNTP (10 mM de cada dNTP) (Promega, EUA); 1 μL de cada oligonucleotídeo (10 μM cada) (BRL, EUA), 1,0 μL de *Taq* DNA polimerase (5U/μL) (Promega, EUA) e 1,5 μL do cDNA. Após o preparo das reações, uma camada de óleo mineral especial (livre de DNase, Sigma, EUA) (40 μL) foi adicionada a cada microtubo para minimizar a evaporação e contaminação durante os ciclos da reação. A máquina utilizada foi um termociclador (mod. PTC-100, EUA), portando bloco com capacidade para 60 reações. A reação foi realizada conforme o programa NEWBIG, da seguinte maneira: desnaturação inicial a 94°C por 5 min, extensão inicial a 74°C por 6 min e 30 ciclos a 94°C por 1 min, 45°C por 2 min, 74°C por 5 min. A extensão final foi realizada a 74°C por 10 min, seguida de um ciclo de 25°C por 2 min para a estabilização do equipamento. Os produtos supostamente amplificados foram armazenados em freezer (-20°C) até o momento de serem utilizados na eletroforese.

Tabela 6 – Concentrações finais dos reagentes utilizados nas reações em cadeia pela polimerase (PCR)

Reagente	PCR			
	1	2 ^a	3 ^b	4 ^c
Tampão (10X) PCR ¹	1 X	1 X	1 X	1 X
MgCl ₂ (25 mM) ¹ (mM)	1,5	3,0	3,0	3,0
Dntp mix (10 mM) ¹ (mM)	0,2	0,2	0,2	0,2
Oligonucleotídeo ² (SIOLIGO3') (10 μM) (μM)	0,2	0,2	0,14	0,14
Oligonucleotídeo ² (NEWSIOLIGO5') (10 μM) (μM)	0,2	0,2	0,14	0,14
<i>Taq</i> DNA polimerase ¹ (%)	1	1	1	0,3
CDNA (%)	3	3	2	2;1; 0,2 e 0,1
Programa de amplificação ³	BIGKWON	NEWBIG	FORSEQ	FORSEQ

¹ Promega, EUA

² BRL, EUA

³ Ver programa de amplificação detalhado na Tabela 7

^a PCR 2: Modificação na concentração final de MgCl₂ (1,5 mM → 3,0 mM)

^b PCR 3: Concentração do MgCl₂ mantida em 3,0 mM e redução de 30% nas concentrações dos oligonucleotídeos (0,2 μM → 0,14 μM)

^c PCR 4: Concentração de MgCl₂ mantida em 3,0 μM

Concentrações dos oligonucleotídeos mantidas em 0,14 μM

Redução na concentração da *Taq* DNA polimerase (1% → 0,3%)

Redução nas concentrações de cDNA (2% → 2%, 1%, 0,2%, 0,1%)

Tabela 7 – Programas de amplificação utilizados nas reações em cadeia pela polimerase do gene codificador da glicoproteína S1

Etapas	Programa de amplificação ¹		
	BIGKWON ²	NEWBIG ³	FORSEQ ⁴
1 – Desnaturação inicial (94°C/5 min)	Sim	Sim	Sim
2 – Extensão inicial (74°C/6 min)	Sim	Sim	Sim
3 – Desnaturação (94°C/1 min)	Sim	Sim	Sim
4 – Anelamento	45°C/2 min	45°C/2 min	50°C/2 min
5 – Extensão (74°C/5 min)	Sim	Sim	Sim
6 – VOLTAR PARA A ETAPA 3	35 vezes	30 vezes	3 vezes
7 – Desnaturação (94°C/1 min)	—	—	Sim
8 – Anelamento (48°C/2 min)	—	—	Sim
9 – Extensão (74°C/5 min)	—	—	Sim
10 – VOLTAR PARA A ETAPA 7	—	—	3 vezes
11 – Desnaturação (94°C/1 min)	—	—	Sim
12 – Anelamento (45°C/2 min)	—	—	Sim
13 – Extensão (74°C/5 min)	—	—	Sim
14 – VOLTAR PARA A ETAPA 11	—	—	28 vezes
15 – Extensão final (74°C/10 min)	Sim	Sim	Sim
16 – 25°C/5 min	Sim	Sim	Sim

¹ Nomes dos programas de amplificação sugeridos pela equipe do Laboratório.

² Programa de amplificação baseado em KWON *et al.* (1993).

³ Programa de amplificação modificado: NEWBIG – modificação apenas no número de ciclos.

⁴ Programa de amplificação modificado: FORSEQ – modificações nas temperaturas de anelamento e no número de ciclos.

Especificidade da amplificação por PCR

A extração do RNA também foi conduzida em líquidos alantoidianos de ovos não-inoculados e de ovos inoculados com a amostra LaSota do vírus da doença de Newcastle (VDN), designado paramyxovirus aviário sorotipo 1 (APMV-1), classificado no gênero *Rubulavirus*, família *Paramyxoviridae* (MURPHY *et al.*, 1995), por ser este vírus RNA e que também infecta galinhas provocando quadros clínicos com sinais parecidos aos da BIG. A extração do RNA e a RT-PCR foram realizadas utilizando os mesmos procedimentos descritos para as outras amostras.

Análise dos produtos amplificados – eletroforese

Após os ciclos de amplificação, 12 µL de cada produto amplificado foram misturados a 8 µL de tampão TBE (Tris-borato-EDTA) 0,5X (BRL, EUA) [100 mM Tris-base; 2,0 mM de solução

0,5 M EDTA (pH 8,0) e 50 mM ácido bórico anidro] e 4 µL de tampão de amostra [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] e submetidos a eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) (livre de DNase, Sigma, EUA), nas dimensões de 3 mm de espessura e 20 • 25 cm (largura X comprimento) em tampão de corrida TBE 0,5X. A corrida foi realizada em TA, voltagem constante (100 V), com tempo médio de cinco horas, em aparelho de eletroforese Horizon 20 • 25 (BRL, EUA). A agarose foi completamente dissolvida no tampão por aquecimento da solução em forno microondas (a solução deve ficar translúcida, sem glóbulos visíveis de agarose). Imediatamente após a corrida, o gel foi corado com corante fluorescente, o brometo de etídio (EtBr), de forma a se obter concentração final de 0,5 µg/mL, durante 30 min, em ambiente escuro.

Moléculas de EtBr intercalam-se entre os nucleotídeos na dupla hélice de DNA, permitindo a observação dos fragmentos presentes no gel. Por se ligar ao DNA, o composto é tido como poderoso agente mutagênico e todo o cuidado foi observado no manuseio da substância. O DNA amplificado foi detectado utilizando-se transiluminador ultravioleta (302 nm - Macrovue™, Hofer/Pharmacia, EUA) e fotografado com câmera especial (GelCam, Polaroid, EUA), equipada com filme Polaroid 667 e filtro laranja nº 15 (Pharmacia, EUA). Para a determinação do tamanho dos produtos de PCR incluiu-se em cada corrida o marcador de tamanho molecular *Lambda* DNA digerido com as enzimas *EcoRI* e *HindIII* (1 µL/canaleta - Promega, EUA), com fragmentos variando entre 125 e 21.226 pb.

Biossegurança

Devido à complexidade e alta sensibilidade da técnica de PCR, foram necessários cuidados extremos para evitar a contaminação cruzada de reagentes. Foi possível conseguir-se a padronização criteriosa da técnica para o diagnóstico seguro e efetivo, obedecendo-se aos cuidados de determinar as condições ideais a cada seqüência a ser amplificada e mantidas as práticas seguras de laboratório. Apesar de a transferência de material amplificado ser a maior fonte de falsos-positivos, a contaminação entre as amostras também pode ocorrer. Desta forma, foram observados cuidados no manuseio, coleta e extração de DNA das amostras. As normas de segurança exigidas para obtenção de boa qualidade foram seguidas na totalidade. Os laboratórios, equipamentos e reagentes para a produção de cDNA e material amplificado foram completamente separados. Além disso, obedeceu-se ao fluxo de trabalho, realizando primeiro todos os procedimentos referentes à extração de RNA, RT e montagem das reações de PCR sem a produção ou presença de material amplificado em determinado laboratório (EXTRALAB), para depois trabalhar no laboratório destinado ao material amplificado (BIOMOL), não retornando, portanto, em hipótese alguma, ao primeiro laboratório. As reações de PCR foram montadas em local livre de contaminações ambientais, em cabine de fluxo laminar exclusiva para manipulações com PCR (livres de DNA), com luvas novas (sem talco), material descartável novo e estéril (livre

de DNase/RNase), não sendo posteriormente reutilizado em testes de biologia molecular. As luvas de manipulação foram descartadas a cada etapa de manipulação diferente. O uso de controles negativos foi imprescindível para se garantir a ausência de resultados falsos-positivos, como em qualquer outro teste de diagnóstico. Cuidados especiais foram adotados com todos os reagentes utilizados na PCR. Estes foram previamente aliquotados em pequenos volumes e em cabine de fluxo laminar no laboratório livre de produtos amplificados, para evitar possíveis contaminações das soluções estoques e, após o uso, o restante das soluções descongeladas sempre foi descartado. As ponteiras e microtubos utilizados foram sempre novos e estéreis e usados, exclusivamente, no preparo das reações. Pipetas foram separadas para serem utilizadas apenas com reagentes da PCR. Todos os reagentes foram sempre manipulados com ponteiras novas, com barreira de aerossol, a fim de prevenir contaminações com aerossóis.

Precauções adicionais foram observadas, como a troca freqüente de luvas, centrifugação rápida dos microtubos antes de abri-los, abertura e fechamento dos microtubos cuidadosamente para evitar aerossóis, mínimo manuseio das amostras, adição de todos os reagentes (dNTPs, oligonucleotídeos, tampão, enzimas, etc) à reação antes da adição da amostra de DNA, fechamento de cada microtubo após a adição de DNA, partindo, somente então, para a próxima amostra.

Após o uso, as soluções e materiais contendo TRIzol, EtBr e material amplificado foram armazenados em garrafas plásticas que, por sua vez, estão guardadas em local seguro para futura destinação adequada.

Os OEG/SPF utilizados na replicação viral, infectados ou não, foram descartados em solução de formol comercial a 10% permanecendo por 72 h em TA, quando eram enviados para o forno crematório.

Além disso, todas medidas gerais de higiene e cuidados necessários em laboratórios foram rigorosamente seguidos.

3.1.3 Resultados e discussão

Das amostras de referência de VBIG, escolheu-se trabalhar com nove delas. Foram selecionadas amostras que representam os sorotipos mais comumente encontrados, deixando de lado amostras que apresentam distribuição geográfica muito restrita. Evitou-se, também, trabalhar com número grande de amostras pertencentes ao mesmo sorotipo, dando preferência àquelas que estavam disponíveis no Banco Criogênico do Setor de Doenças das Aves do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária, UFMG.

É de grande importância a otimização da extração do RNA (SAMBROOK *et al.*, 1989) e a prevenção da introdução de RNases na preparação de RNA ou outros reagentes. Existem inúmeros protocolos disponíveis que envolvem diferentes detergentes e enzimas para o processo de extração. No entanto, vários protocolos incluem procedimentos bastante trabalhosos para extração do DNA/RNA viral, inviabilizando sua adoção na rotina laboratorial. Dessa forma, esta etapa foi executada com muito critério e utilizando reagentes de alta qualidade.

O RNA viral foi extraído, por procedimento rápido, do líquido alantoidiano de OEG/SPF inoculados com diferentes amostras do VBIG. Como pode ser verificado nos resultados obtidos, o reagente TRIzol LS (GIBCO/Life Technologies, EUA, que é método tradicional de extração química com agente caotrópico, adaptado do método de Chomczynski & Sacchi (1987), além de ser rápido e muito simples, foi também efetivo. LE GALL *et al.* (1998) também utilizaram, com bons resultados, o TRIzol LS para extração de RNA de amostras provenientes de diferentes órgãos. Além disso, a estocagem de amostras no TRIzol anteriormente à extração de RNA possibilita a conservação do RNA viral durante semanas, até mesmo em temperatura ambiente. Neste trabalho, utilizou-se, com resultados satisfatórios, o RNA total e não o purificado, o que poderia, pela maior manipulação, produzir alterações ou degradações no RNA bem como contaminações. No entanto, a purificação do RNA anteriormente à reação de RT-PCR pode ser, segundo KWON *et al.* (1993), necessária para a remoção de inibidores inespecíficos.

Ao extrair inicialmente o DNA e RNA total de células infectadas com vírus para o diagnóstico por PCR, extrai-se indiscriminadamente tanto o RNA viral como grande quantidade do DNA (e RNA) total da célula. A correta escolha de oligonucleotídeos permite a amplificação apenas do genoma viral ou segmento do genoma que contenha o gene específico que se queira diagnosticar. A seleção criteriosa de oligonucleotídeos é criticamente importante, já que eles determinam a sensibilidade e especificidade da reação (ZWAAGSTRA *et al.*, 1992).

Neste estudo, foram utilizados oligonucleotídeos desenhados por KWON *et al.* (1993) e JACKWOOD *et al.* (1997), que foram capazes de hibridizar em 100% das amostras de referência (9/9) e 99,33% dos isolados virais (14/15), a taxa de detecção do VBIG pela RT – PCR do gene codificador da proteína S1 foi de 99,33% (23/24).

Houve amplificação do segmento genômico esperado de todas as amostras estudadas, exceto do isolado viral TII, da amostra heteróloga (VDN – controle de especificidade) e do controle negativo (líquido alantoidiano) (Figura 6). As ausências de amplificações de DNAs nos controles (VDN e líquido alantoidiano) indicam que os oligonucleotídeos utilizados foram VBIG específicos. Os DNAs amplificados co-migraram semelhantemente em gel de agarose 1% caracterizando tamanho aproximado de 1,7 Kb, com variações entre algumas amostras. Isto indica que, aparentemente, a região em estudo de algumas amostras foi variável apresentando algumas deleções ou inserções. Diferenças nas sequências nucleotídicas dos genes da glicoproteína S1 são relatadas para diversas amostras do VBIG (BINNS *et al.*, 1985; KUSTERS *et al.*, 1989). Também foram observadas variações nas intensidades de algumas bandas entre os isolados de VBIG. Essas variações podem ser atribuídas às diferenças na qualidade das amostras de DNA. Além disso, tais variações podem, também, ser resultantes de maior homologia entre os oligonucleotídeos e os sítios de anelamento em alguns isolados, resultando em amplificações mais eficientes (WILLIAMS *et al.*, 1990; PERMAUL *et al.*, 1996).

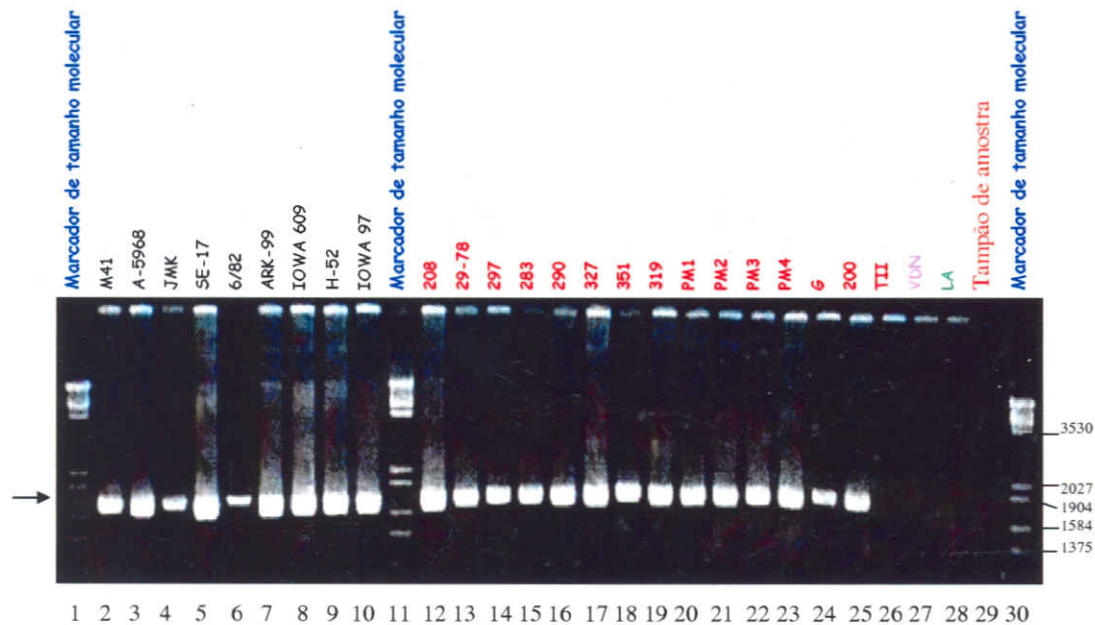


Figura 6 - Produtos de RT-PCR em gel de agarose 1% corado por brometo de etídio. Reação otimizada. Parâmetros utilizados: 1,0 μ L cDNA, 3,0 mM de $MgCl_2$; programa NEWBIG. Canaletas 1, 11 e 30 (em azul): marcador de tamanho molecular Lambda DNA/*Eco*RI + *Hind*III (Promega); canaletas 2 a 10 (em preto): amostras de referência; canaletas 12 a 26 (em marrom): isolados de campo; canaleta 27 (em rosa): vírus da doença de Newcastle (VDN) (LaSota); canaleta 28 (em verde): líquido alantoidiano (LA); canaleta 29 (em vermelho): tampão de amostra. Os números à direita indicam os fragmentos do marcador de tamanho molecular Lambda DNA/*Eco*RI + *Hind*III. A seta à esquerda corresponde ao produto amplificado (~1,7 Kb).

Os dados mostrados neste estudo estão de acordo com resultados publicados previamente, obtidos em diferentes países, com outros isolados de VBI, utilizando os mesmos oligonucleotídeos. KWON *et al.* (1993) também obtiveram a amplificação dos genes da glicoproteína S1 de 100% (11/11) as amostras de referência analisadas. Das amostras de referência, cinco (M41, Conn, JMK, Iowa 97 e SE-17) foram semelhantes às utilizadas neste estudo. Em se tratando dos isolados de campo de VBI, um dos 20 isolados analisados, não foi amplificado. WANG & TSAI (1996) usando os mesmos oligonucleotídeos propostos por KWON *et al.* (1993) obtiveram a amplificação de somente 75% (3/4) das amostras de referência (H120, JMK, Holte e Conn), não obtendo a amplificação da amostra Holte. Por outro lado, quando estes

pesquisadores utilizaram outros oligonucleotídeos (C2U-C3L) flanqueando a HVR 1 (nt 142-320), contida no gene codificador da proteína S1, todas as amostras de referência e todos os isolados provenientes de Taiwan foram amplificados. WANG *et al.* (1996) obtiveram a amplificação de todos (7/7) isolados de VBI estudados. Os pesquisadores não utilizaram os mesmos oligonucleotídeos descritos por KWON *et al.* (1993) porque, em estudos preliminares, alguns dos isolados não apresentaram os produtos de PCR amplificados. Portanto, optaram por utilizar oligonucleotídeos propostos por WANG *et al.* (1994), cujos produtos de PCR apresentaram-se um pouco maior (1745 pb) que aqueles obtidos por KWON *et al.* (1993). Com o decorrer dos anos, JACKWOOD *et al.* (1997) verificaram que alguns isolados do sorotipo

Arkansas (determinados por sorologia convencional) não estavam sendo amplificados pelos oligonucleotídeos utilizados por KWON *et al.* (1993). Sendo assim, descreveram algumas modificações em relação ao teste proposto originalmente por KWON *et al.* (1993). Entre elas, a seqüência do oligonucleotídeo da terminação 5' e a concentração final de MgCl₂ que passou de 2,8 a 3,4 mM.

No nosso caso, utilizando um dos oligonucleotídeos propostos por KWON *et al.* (1993) e o outro já modificado por JACKWOOD *et al.* (1997) e concentração final de 3,0 mM de MgCl₂ não obtivemos a amplificação de um dos isolados de VBIG.

Todas as amostras, com exceção de uma (TII), foram amplificadas, indicando que tais amostras não apresentaram inserções ou deleções aparentes na região de anelamento dos oligonucleotídeos. A técnica de PCR determina, "por si", a presença ou ausência de determinada região no DNA se amplificar o produto esperado e essa eventual amplificação do produto vai depender da presença de deleções no segmento. A ausência de amplificação da amostra TII pode ser explicada pela menor sensibilidade de reações de RT-PCR, cujo alvo são fragmentos grandes (SILVEIRA & MARQUES, 1995), ou pela presença de alterações na seqüência do gene S1 complementar aos oligonucleotídeos utilizados, sendo, provavelmente, amostra variante. No entanto, para que esta amostra seja caracterizada como variante faz-se necessária a comprovação científica. O isolado viral TII não foi amplificado pelos oligonucleotídeos utilizados neste estudo, mas foi em estudos realizados anteriormente por RESENDE *et al.* (1998) e ABREU (2000) usando a RT-PCR para amplificar parte do gene S2 e parte do gene N, respectivamente. Esta amostra foi isolada em 1975 a partir de frangos de corte com sinais respiratórios, no entanto, acredita-se que tais características não tenham interferido na ausência de amplificação, uma vez que outra amostra (G), com essas mesmas características, foi amplificada utilizando os mesmos oligonucleotídeos.

Este mesmo isolado viral, em trabalho anterior realizado por PANIAGO (1994), foi o único que não apresentou atividade hemaglutinante após tratamento com fosfolipase C tipo 1. A indução da atividade hemaglutinante pela fosfolipase C

tipo 1 provavelmente é provocada pela hidrólise da fosfatidilcolina no envelope do VBIG, o que resultaria em ligeira alteração nas características físicas desta membrana, gerando nova configuração tridimensional de polipeptídeos necessária para a hemaglutinação (BINGHAM, 1975). Entretanto, ainda não está claro o motivo de algumas amostras não apresentarem tal atividade após tratamento enzimático. Isto pode ser devido à relativa instabilidade das glicoproteínas, que são passíveis de serem perdidas durante o processo de obtenção de antígenos a partir do vírus completo.

Algumas hipóteses são levantadas para poder explicar a limitada habilidade para amplificar seqüências do gene S1 do VBIG. Possíveis variações genômicas existentes entre diferentes amostras do VBIG podem interferir na sensibilidade de testes como a PCR, alterando seu poder de detecção de acordo com as características individuais de cada amostra. Devido à alta variabilidade das seqüências entre diferentes amostras do VBIG, tem sido difícil desenhar oligonucleotídeos que sejam capazes de monitorar todos os isolados de VBIG, especialmente no gene S1, que contém regiões hipervariáveis (WANG & TSAI, 1996).

Uma vez que a RT-PCR seja técnica altamente sensível, é importante evitar resultados falsos-positivos causados pelo anelamento de oligonucleotídeos inespecíficos e amplificação; para detectar e evitar resultados falsos todo teste realizado incluiu controles positivo e negativo. O uso apropriado de controles é requerido para testar a performance do ensaio e possíveis contaminações cruzadas (JACKWOOD *et al.*, 1997). O teste RT - PCR descrito aqui foi muito específico, obtiveram-se reações positivas somente para os RNAs extraídos de líquidos alantoidianos infectados com VBIG.

Prova definitiva desta especificidade pode ser obtida pelo seqüenciamento dos produtos de PCR (ANDREASEN *et al.*, 1991; ZWAAGSTRA *et al.*, 1992), analisando estes pela digestão com enzimas de restrição (LIN *et al.*, 1991; KWON *et al.*, 1993; SONG *et al.*, 1998) ou hibridização (JACKWOOD *et al.*, 1992).

Embora oligonucleotídeos com variadas temperaturas de anelamento (48 e 54°C) foram satisfatoriamente usados neste estudo; é, ainda,

preferível evitar oligonucleotídeos com temperaturas de anelamento muito diferentes. Além disso, a qualidade da RT-PCR é também afetada por outros fatores, tais como a localização genômica utilizada para a seleção do oligonucleotídeo e o comprimento do produto amplificado (CUYPERS *et al.*, 1992; BEARDSLEY *et al.*, 1996).

Quatro pares de oligonucleotídeos genótipo-específicos foram desenhados por HANDBERG *et al.* (1999) baseados em seqüências do gene S e quando utilizados em RT-PCRs com o RNA extraído de fragmentos traqueais de galinhas infectadas experimentalmente; o genoma do VBIG foi detectado em 58 a 92% das aves, dependendo da amostra viral. Caso teste grupo específico seja requerido, a RT-PCR deve amplificar a região conservada do VBIG presente em todas as amostras (ANDREASEN *et al.*, 1991). Quando os oligonucleotídeos utilizados não reconhecem todas as amostras do VBIG, resultados falsos-negativos podem ocorrer (JACKWOOD *et al.*, 1997). Os oligonucleotídeos para testes de RT-PCR grupo-específicos devem ser, segundo ANDREASEN *et al.* (1991), complementares aos segmentos do VBIG nos genes codificadores da proteína da membrana ou da proteína do nucleocapsídeo. Muito embora os genes codificadores do nucleocapsídeo e da membrana representem bons alvos para o desenho de oligonucleotídeos que possam ser usados para a identificação de coronavírus, a heterogeneidade da seqüência (regiões conservadas, variáveis e hipervariáveis) encontrada no gene S1 permite o seu uso para o desenho de oligonucleotídeos tanto para a identificação quanto para a classificação do VBIG (KEELER *et al.*, 1998).

Na maioria das ocasiões, quando a PCR é realizada com o propósito de amplificar segmento específico de DNA, são tomadas todas as precauções para se evitar que os oligonucleotídeos hidridizem em regiões diferentes daquelas homólogas. Não se pode excluir a possibilidade de resultados falso-positivos devido a possíveis contaminações durante as etapas de PCR. Porém, todas as precauções possíveis foram tomadas. Neste estudo, foram adotadas duas abordagens. A primeira consistiu em estabelecer rigoroso esquema de trabalho, conforme descrito no item 3.10 (Biossegurança), com a finalidade de se

eliminar a presença de moléculas de DNA contaminantes (todas aquelas diferentes do DNA molde), tanto no mix da reação como nos equipamentos e reagentes utilizados. A sensibilidade da PCR, que permite a produção de bilhões de cópias de DNA a partir de única molécula alvo, torna efetivo o problema de contaminações de reações. A segunda abordagem consistiu em otimizar as condições de trabalho desta reação, sendo em consequência testadas diferentes variáveis que influenciariam no comportamento da reação. Definidas as melhores condições, estas foram mantidas constantes de reação a reação. Alguns trabalhos na literatura têm levantado questões sobre a falta de reprodutibilidade dos perfis obtidos nas técnicas baseadas em PCR. Na prática, a padronização dos procedimentos utilizados é capaz de evitar tais inconvenientes.

Já na primeira PCR realizada neste estudo, obteve-se forte banda de 1,7 Kb em gel de agarose 1%, com exceção da amostra de referência UK 6/82 e do isolado viral G, cujas bandas apresentaram-se fracas. No emprego da técnica de PCR foi necessário o uso de algumas adaptações a partir do protocolo original, a fim de padronizar as condições de amplificação para a obtenção de melhores resultados com as amostras analisadas. Este método é bastante sensível a qualquer alteração na concentração dos componentes na amostra de reação (DNA, MgCl₂, oligonucleotídeos, dNTPs, etc.) ou nas temperaturas de desnaturação, anelamento e extensão, podendo modificar completamente os produtos obtidos, resultantes da amplificação. O processo de otimização foi justificado pelos bons resultados obtidos após a padronização da técnica. A primeira estratégia utilizada para aperfeiçoar a PCR foi a de diminuir o número de ciclos (35 → 30) e aumentar a concentração final do MgCl₂ (1,5 mM → 3,0 mM), passar do programa BIGKWON para o NEWBIG. A PCR padronizada, nessas condições, resultou na obtenção de produtos com bandas mais evidentes que as observadas com o programa descrito por KWON *et al.* (1993), principalmente para a amostra de referência UK 6/82 e o isolado G. A concentração final de MgCl₂ de 3,0 mM foi, a partir de então, mantida em todas as outras reações. JACKWOOD *et al.* (1997), em estudos para classificação de isolados do VBIG pela técnica de RT-PCR/RFLP, observaram que a presença de determinadas bandas estava

vinculada a concentração de $MgCl_2$. A determinação da concentração ótima de $MgCl_2$ no tampão de PCR pode exercer grande influência no sucesso da PCR e é decisiva na obtenção de resultados consistentes (JACKWOOD *et al.*, 1997), podendo variar até mesmo para diferentes iniciadores da mesma região de determinado DNA molde (SAIKI, 1989). JACKWOOD *et al.* (1997) têm amplificado o VBIG diretamente de swabs traqueais de aves infectadas naturalmente, porém muito esforço e tempo são necessários para o ajuste da concentração de $MgCl_2$.

Além da enorme popularidade da tecnologia de PCR, outra possível razão para o crescente aumento de protocolos de PCR para determinada doença é a ênfase dada à necessidade de otimização (SAIKI, 1989; INNIS & Gelfand, 1990; BOLEDA *et al.*, 1996).

A terceira e quarta PCRs, assim como o programa FORSEQ, foram realizadas com o objetivo de se otimizar a reação para seqüenciamento direto do produto de PCR sem a necessidade de purificação do produto. No entanto, após algumas tentativas, não se obteve resultados satisfatórios para a proposta inicial, sendo necessário realizar a purificação da banda específica de DNA excisada do gel de agarose. Sendo assim, devido aos melhores resultados obtidos, optou-se por conduzir as PCRs de acordo com o programa NEWBIG.

O total de ciclos em PCR é geralmente mantido no máximo por volta de 30 a 35, em média, para evitar que, havendo a possibilidade de incorporação de mutações – a eventual incorporação pela polimerase de nucleotídeos errados – não ocorra a subsequente amplificação exponencial destes erros, pois resultaria em falhas na especificidade do produto final amplificado.

O diagnóstico da BIG pelos métodos convencionais pode demorar semanas. Desde a sua descoberta, a PCR tornou-se das mais importantes ferramentas tanto no diagnóstico quanto nas pesquisas médica e veterinária. Esta técnica requer quantidades mínimas de ácido nucleico vírus-específico e fornece, além disso, um diagnóstico mais sensível; permite redução no manuseio das amostras e reduz o tempo necessário ao diagnóstico, pela eliminação da

necessidade de adaptação dos isolados virais para o crescimento em outros substratos celulares.

O procedimento inteiro, incluindo transcrição reversa, síntese de cDNA e amplificação do DNA, foi realizado, neste trabalho, em aproximadamente dois dias; no entanto, o mesmo pode ser completado dentro de 12 h (FALCONE *et al.*, 1997). A especificidade, sensibilidade, facilidade no uso e redução do tempo necessário para RT-PCR do VBIG indicam o potencial desta técnica para a aplicação como teste laboratorial rápido no diagnóstico de rotina.

A reação de PCR, neste estudo, permitiu a amplificação das amostras estudadas (com exceção de uma amostra), sendo possível prosseguir na realização dos estudos subsequentes, com reações de digestão do DNA por enzimas de restrição. Os produtos amplificados por PCR foram, então, analisados pela técnica de polimorfismo nos comprimentos dos fragmentos de restrição e por seqüenciamento para identificar variantes do VBIG para fins de estudos epidemiológicos.

3.2 Classificação de Isolados do Vírus da Bronquite Infecciosa das Galinhas Pela Análise do Polimorfismo nos Comprimentos dos Fragmentos de Restrição (RFLP) do Gene Codificador da Glicoproteína S1

3.2.1 Introdução

O avanço constante da ciência tem permitido o desenvolvimento de metodologias cada vez mais apropriadas para o estudo da diversidade genética dos organismos. Até meados de 1960, os estudos envolvendo sistematica eram quase exclusivamente baseados na análise da variação morfológica e comportamental. Entretanto, com a elucidação das bases moleculares da hereditariedade, as macromoléculas biológicas têm assumido papel crescente e importante nos estudos evolutivos em geral. As proteínas e os ácidos nucleicos começaram a ser, então, utilizados como marcadores para o exame da estrutura fenotípica e genética das populações ou para estimar relações entre táxons.

O estudo da variabilidade genética de organismos foi amplamente beneficiado com a aplicação de técnicas de biologia molecular. A capacidade de examinar diretamente o DNA permitiu atingir altos níveis de sensibilidade e detalhamento, contornando os problemas relacionados à expressão gênica ou influências ambientais. As características das moléculas de DNA, tais como ubiqüidade, estabilidade e plasticidade permitem para estudos evolutivos e de polimorfismos.

O desenvolvimento e as aplicações de metodologias baseadas na PCR revolucionaram e facilitaram a comparação de amostras de DNA. As principais causas do sucesso destas metodologias são a simplicidade de seus protocolos, custo reduzido, rapidez de execução, fidedignidade e reprodutibilidade, além da ampla aplicabilidade.

A especificidade do DNA amplificado por PCR pode ser mais seguramente confirmada por outros métodos. Um destes é a análise do DNA com enzimas de restrição. Seqüências de DNA diferentes formarão distintos mapas de restrição, demonstrados por diferenças no número ou tamanho dos fragmentos gerados pelas enzimas usadas para clivar o DNA.

A principal aplicação da análise de DNA viral com enzimas de restrição está na área de diagnóstico de amostras virais variantes.

O VBIg, apesar de ser vírus de estrutura relativamente pouco complexa, se comparada a outros vírus, tem importante capacidade de introduzir mutações nas suas seqüências de genes e gerar novas amostras virais que podem apresentar significativas e importantes variações antigênicas em suas proteínas externas, quando comparadas diferentes amostras isoladas a campo. Variações antigênicas entre diferentes vírus são normalmente determinadas por testes imunológicos. No entanto, mais recentemente, com base em que estas variações são definidas na molécula pela seqüência do genoma, técnicas que permitem o isolamento de genes e caracterização do seu perfil molecular, têm também sido aplicadas no diagnóstico de amostras variantes. Entre estas está a análise com enzimas de restrição que, ao clivarem seqüências específicas de DNA, permitem estabelecer perfil

conforme o número e tamanho dos fragmentos gerados.

O VBIg caracteriza-se pela presença de inúmeros sorotipos devido a regiões variáveis na seqüência de aminoácidos da proteína S1 e em diferenças na capacidade neutralizante de anticorpos induzidos por S1, expressas em diferentes amostras do VBIg. Dessa maneira, a proteína S1 é considerada o principal componente do vírus responsável pela habilidade de diferentes sorotipos do VBIg quebrarem a resposta vacinal, quando da infecção por amostras de campo suficientemente heterólogas à amostra vacinal (CAVANAGH *et al.*, 1997).

O preciso diagnóstico e definição das relações entre diferentes amostras do VBIg prevalentes em regiões de intensa produção avícola são importantes para a adoção de medidas de controle, tais como o delineamento de estratégias de vacinação ou avaliar a real necessidade de desenvolvimento e introdução de novas amostras vacinais, mais antigenicamente relacionadas aos sorotipos do VBIg variantes prevalentes em surtos da doença.

A técnica de PCR, aliada à análise com enzimas de restrição do gene que codifica a proteína S1, é mais rápida para o diagnóstico e permite, ao mesmo tempo, determinar variações moleculares entre diferentes amostras isoladas do VBIg.

Desse modo, com o objetivo de contribuir para melhor entendimento do VBIg, em Minas Gerais e no Brasil, este estudo foi conduzido para:

- caracterizar a presença de polimorfismo entre os isolados de VBIg oriundos de diferentes regiões de Minas Gerais, utilizando a técnica de RT-PCR/RFLP;
- relacionar o polimorfismo genético encontrado entre as amostras em estudo com o ano de isolamento, tipo de ave do qual foram isoladas e o quadro clínico apresentado pelas mesmas;
- analisar os dados gerados pela construção de fenograma que poderá elucidar as posições taxonômicas destas amostras e inferir sobre as suas relações filogenéticas.

3.2.2 Material e métodos

Purificação das bandas correspondentes aos produtos de PCR

Quarenta microlitros do produto amplificado de cada amostra foram misturados a 8 µL de tampão de amostra [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] e submetidos à eletroforese em gel de agarose *low melting* 1,5% (p/v) (livre de DNase, Sigma, EUA), nas dimensões de 3 mm de espessura e 20 X 25 cm (largura X comprimento) em tampão de corrida TBE 0,5X. Foram necessárias duas canaletas do gel/amostra, cada uma contendo 20 µL da mistura de DNA amplificado + tampão de amostra. A corrida foi realizada em TA, voltagem constante (100 V), com duração de 4 h e 25 min, em aparelho de eletroforese Horizon 20 • 25 (BRL, EUA). Imediatamente após a corrida, o gel foi corado com EtBr, de forma a se obter concentração final de 0,5 µg/mL, durante 30 min, em ambiente escuro. Para a determinação do tamanho dos produtos de PCR incluiu-se em cada corrida o marcador de tamanho molecular *Lambda* DNA digerido com as enzimas *Eco*RI e *Hind*III (1 µL/canaleta – Promega, EUA).

Durante a observação dos produtos em gel de agarose *low melting* 1,5%, com auxílio de luz UV de mão (302 nm), as bandas específicas do DNA foram recortadas, o mais rapidamente possível, para minimizar a exposição do DNA aos raios UV e colocadas em tubos de microcentrífuga de 1,5 mL revestidos com papel alumínio e armazenadas em *freezer* (-20°C), até o momento de serem utilizadas para a purificação. As purificações foram realizadas utilizando-se o “kit” WIZARD™ PCR Preps DNA Purification System (Cat. # A7170 – Promega, EUA). A utilização deste kit obedeceu ao protocolo indicado pelo fabricante, com a seguinte modificação: no passo final, o DNA retido na mini coluna foi reconstituído em 50 µL de água ultrapura estéril, aquecida a 56°C (modificado), permanecendo em repouso por aproximadamente um minuto, sendo, em seguida, centrifugado durante um minuto (modificado) a 10.000 X g para eluir o fragmento de DNA. Após a purificação, as amostras foram concentradas em

speed vacuum (Centrивap Concentrator/LABCONCO, EUA) a 60°C durante 10 min.

Dosagem de DNA

As amostras de DNA foram dosadas em espectrofotômetro (GeneQuant/Pharmacia, EUA) a 260 nm, sendo o grau de pureza das amostras determinado pela relação da absorvância a 260/280 nm. As concentrações de DNA dos isolados virais e das amostras de referência variaram entre 0,302 (amostra de referência UK/6/82) a 0,612 pmol/µL (isolado 297).

Digestão enzimática dos produtos amplificados e purificados

Os produtos amplificados e purificados foram digeridos com as enzimas de restrição *Bst*YI (cliva no sítio de restrição: 5' Pu ▼ GATCPy 3'), *Hae*III (5' GG ▼ CC 3') e *Xcm*I (5' CCANNNNN▼NNNTGG 3') (New England Biolabs, EUA) de acordo com as especificações do fabricante. A escolha dessas enzimas de restrição, neste trabalho, deu-se a partir de dados já descritos na literatura, nos quais essas enzimas foram utilizadas com sucesso (KWON *et al.*, 1993; JACKWOOD *et al.*, 1997). A digestão enzimática de cada DNA foi realizada separadamente para cada enzima. Mistura dos componentes (acompanham as enzimas) foi preparada contendo 2,0 µL do respectivo tampão (Tabela 8), 1,0 µL da enzima, adicionando, em seguida, água ultrapura livre de DNase estéril, até o volume final de 16 µL para cada DNA amplificado a ser digerido. No caso da enzima *Bst*YI, acrescentou-se 0,2 µL de BSA acetilado (*Bovine Serum Albumine* – albumina de soro bovino) (10 µg/µL) anteriormente à adição da água ultrapura livre de DNase estéril. Durante o preparo da mistura, a enzima foi o último item a ser retirado do *freezer*. Trabalhou-se rapidamente com a enzima, retirando-a do *freezer* para o gelo, e imediatamente retornando-a para o *freezer* após a pipetagem. Após a homogeneização delicada desta mistura, foram adicionados 4 µL de cada DNA amplificado ao microtubo correspondente, promovendo nova homogeneização delicada para ter certeza que o DNA e a mistura de digestão entraram em contato. Estas soluções foram incubadas a 37°C (*Hae*III e *Xcm*I) ou 60°C (*Bst*YI) de acordo com a enzima, por quatro horas, tampa quente, no termociclador (mod.

PTC-100, EUA) e permaneceram no *freezer* (-20°C) até a análise dos produtos da digestão

enzimática. As concentrações inicial e final dos reagentes encontram-se na Tabela 9.

Tabela 8 – Composições dos tampões de reação das enzimas de restrição

Enzima de restrição ¹	Tampão de reação
<i>Bst</i> Y I	10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT (pH 7,9 @ 25°C). Suplementar com 100 µg/mL BSA
<i>Hae</i> III e <i>Xcm</i> I	50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT (pH 7,9 @ 25°C)

¹ New England Biolabs, EUA

Tabela 9 – Concentrações inicial e final dos reagentes utilizados nas reações de digestão enzimática

Reagentes ¹	Concentração inicial	Concentração final
Tampão da enzima	10 X	1 X
BSA	10 µg/µL (100 X)	0,1 µg/µL (1 X)

¹ New England Biolabs, EUA

Análise dos produtos da digestão enzimática – eletroforese

As amostras, após as reações de digestão enzimática, foram submetidas à eletroforese em géis de agarose e poliacrilamida não desnaturante para a observação dos perfis de restrição. Imediatamente anterior à realização da eletroforese, o produto digerido foi homogeneizado delicadamente, sendo, em seguida, incubado a 65°C por 10 min no termociclador (PTC – 100). Este passo é importante para desagregar os eventuais reanelamentos que ocorrem entre os fragmentos de DNA em produtos digeridos.

Gel de agarose 2%

Em cada canaleta do gel foi colocada a mistura de 3 µL do tampão de amostra Blue/Orange 6X Loading Dye (Promega, EUA) e 15 µL do produto amplificado. A mistura foi analisada em gel de agarose 2% (p/v) (livre de DNase, Sigma,

EUA), nas dimensões de 3 mm de espessura e 20X25 cm (largura X comprimento). A corrida foi realizada em aparelho de eletroforese Horizon 20 • 25 (BRL, EUA), em voltagem constante (100 V), por 7 h e 15 min (*Bst*YI e *Xcm*I) e 7 h e 20 min (*Hae*III), à TA, tendo como tampão de corrida o TBE 0,5X. Para a determinação dos tamanhos dos produtos digeridos, além do marcador de tamanho molecular *Lambda* DNA digerido com as enzimas *Eco*RI e *Hind*III (conforme estudo anterior), incluiu-se também o marcador de tamanho molecular 100 bp DNA Ladder (5 µL/canaleta – Promega, EUA), com fragmentos de 100 a 1.000 pb (variação de 100 pb entre eles) e mais um fragmento adicional de 1.500 pb. Imediatamente após a corrida, os géis foram corados com solução de EtBr, de forma a se obter concentração final de 0,5 µg/mL, durante 30 min em ambiente escuro. O DNA amplificado foi visto utilizando-se transiluminador ultravioleta (302 nm – Macrovue TM, Hoefer/Pharmacia, EUA) e fotografado com câmera especial (Gelcam, Polaroid, EUA).

Gel de poliacrilamida 6%

Em cada canaleta do gel foi colocada a mistura de 2 µL do tampão de amostra Blue Orange 6X Loading Dye (Promega, EUA) e 5 µL da amostra referente. A eletroforese foi efetuada em voltagem constante (80 V), por 4 h e 30 min, à TA, tendo como tampão de corrida o TBE 1X. Para a determinação dos tamanhos dos produtos digeridos foram incluídos, em cada corrida, os mesmos marcadores de tamanho molecular utilizados na eletroforese em gel de agarose 2%. Em seguida à eletroforese, estes géis foram submetidos ao processo de coloração pela prata, de acordo com o protocolo modificado, descrito por SANTOS (1993). Assim, após a corrida, os géis foram colocados em solução fixadora (etanol 10,0% e ácido acético 0,5%), sob suave agitação, por 5 min e, em seguida, em solução oxidante (nitrate de prata 0,15% e solução fixadora 50,0 %) por 10 min, sendo então, lavados rapidamente em água destilada. Os géis foram transferidos para a solução reveladora (NaOH 0,75 M e formaldeído 37%), permanecendo, sob suave agitação, até o aparecimento das bandas. Após a revelação, os géis foram novamente transferidos para a solução fixadora.

Análise dos dados e construção do fenograma

Para a análise dos géis, foram feitas fotografias dos géis de agarose com câmera especial (GelCam, Polaroid, EUA), equipada com filme Polaroid 667 e filtro laranja número 15 (Farmacia, EUA), que foram analisadas visualmente.

O software NTSYSpc (*Numerical Taxonomy System* versão 2.0 Copyright 1990 Applied Biostatistics, Inc., EUA) foi usado para calcular a proporção de bandas compartilhadas entre as amostras, sendo originalmente desenvolvido para o uso em biologia, no campo da taxonomia numérica (ROHLF, 1990). Os dados obtidos de

cada amostra, pela observação da presença ou ausência de bandas nos géis, foram organizados de forma a serem lidos pelo programa de análise de dados. Relações filogenéticas entre organismos são estimadas medindo o número de fragmentos de DNA digeridos em comum.

Os dados obtidos foram, então, agrupados pelo Método da Média Aritmética não Ponderada – UPGMA (*Unweighed Pair-Group Method with Arithmetic Mean*) e usados na construção de um diagrama, em forma de fenograma, representando os resultados das análises.

3.2.3 Resultados e discussão

Desde a identificação inicial do VBIG até os dias atuais, diversas técnicas foram aplicadas na identificação e caracterização desse vírus. Com o decorrer dos anos, foram surgindo novas técnicas bioquímicas e moleculares que foram utilizadas na tentativa de esclarecer a posição taxonômica de algumas amostras do VBIG.

Além das vantagens já descritas, a escolha da técnica de RFLP para a caracterização do VBIG, neste trabalho, deu-se a partir de dados já descritos na literatura (KWON *et al.*, 1993; WANG & TSAI, 1996; JACKWOOD *et al.*, 1997), nos quais esta técnica foi utilizada com sucesso para caracterização do VBIG. Neste estudo, foi utilizado o método proposto por KWON *et al.* (1993) para tipificar os isolados de VBIG, sendo o método de tipificação por genótipos maneira alternativa para agrupar novas amostras variantes do VBIG (WANG *et al.*, 1996).

Nove amostras de referência e 14 isolados do VBIG, amplificados por RT-PCR do gene S1, foram classificados por RFLP. Os isolamentos virais foram realizados no período compreendido entre 1972 e 1989. Os perfis de restrição gerados pela digestão com as enzimas de restrição *Bst*YI, *Hae*III e *Xcm*I podem ser observados nas Figuras 7, 8 e 9, respectivamente.

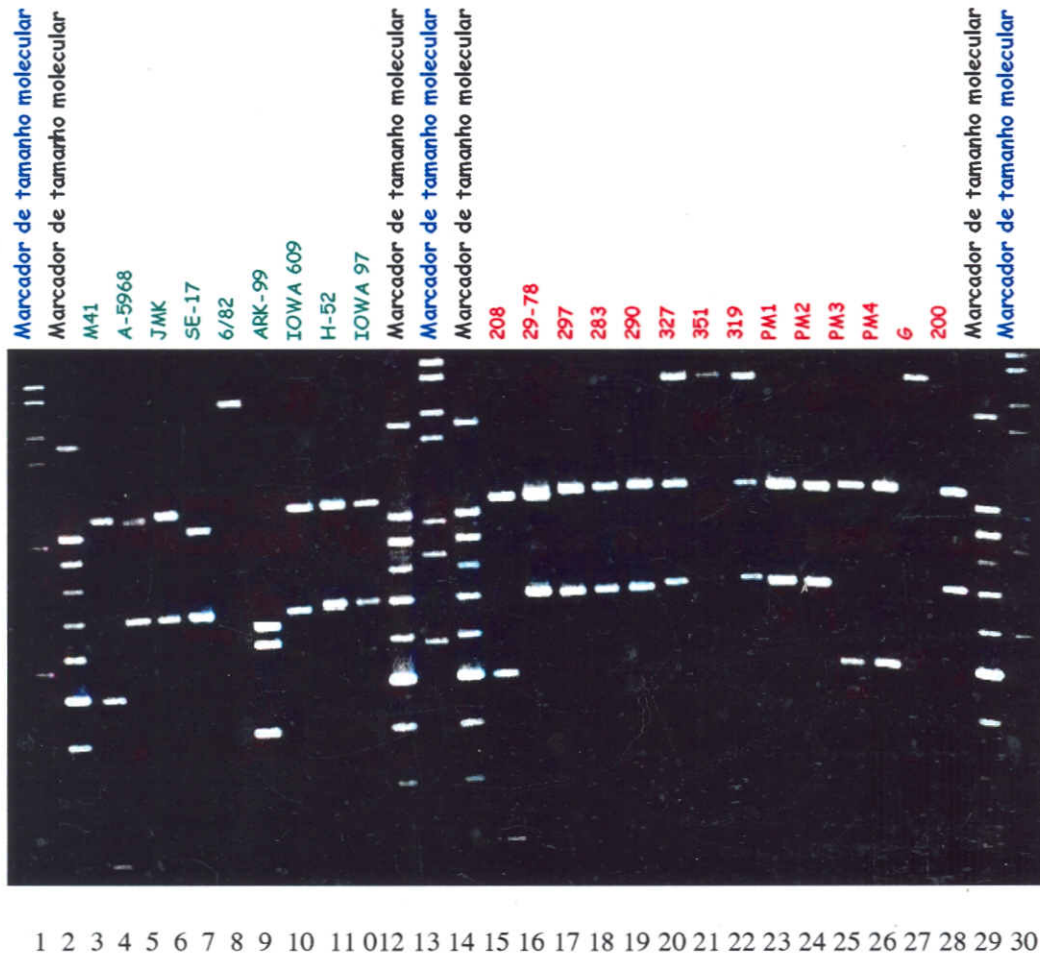


Figura 7 - Perfil de restrição enzimática em gel de agarose 2% (corado por brometo de etídio) dos produtos amplificados (gene S1 do VBIG das amostras de referência e dos isolados virais) por RT-PCR e digeridos com *Bst*YI. Canaletas 1, 13 e 30 (em azul): marcador de tamanho molecular Lambda DNA/*Eco*RI + *Hind*III (Promega); canaletas 2, 12, 14 e 29 (em preto): marcador de tamanho molecular DNA Ladder 100 pb (Promega); canaletas 3 a 11 (em verde): amostras de referência; canaletas 15 a 28 (em marrom): amostras brasileiras isoladas em plantéis avícolas do estado de Minas Gerais.

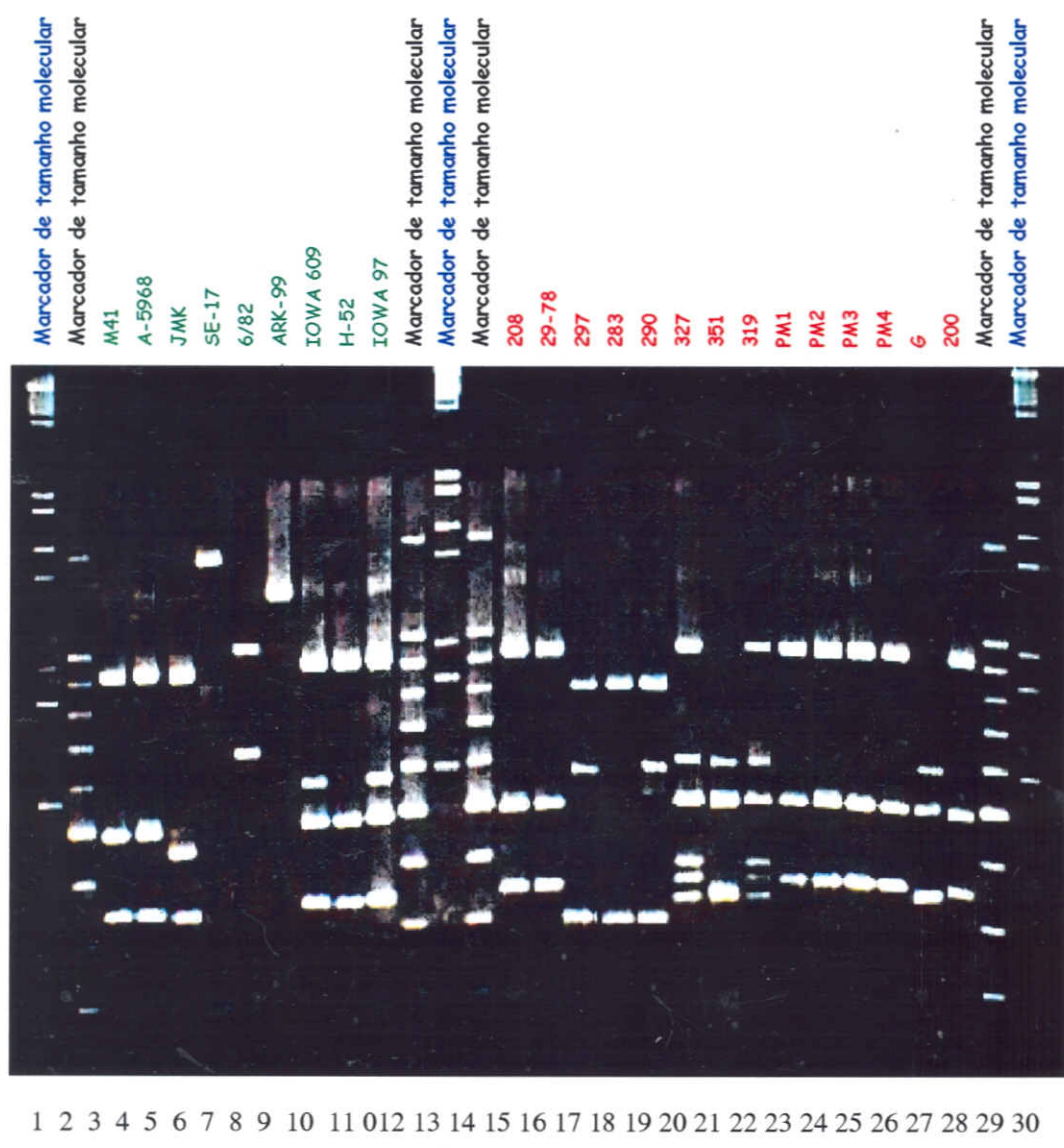


Figura 8 - Perfil de restrição enzimática em gel de agarose 2% (corado por brometo de etídio) dos produtos amplificados (gene S1 do VBIg das amostras de referência e dos isolados virais) por RT-PCR e digeridos com *Hae*III. Canaletas 1, 13 e 30 (em azul): marcador de tamanho molecular Lambda DNA/*Eco*RI + *Hind*III (Promega); canaletas 2, 12, 14 e 29 (em preto): marcador de tamanho molecular DNA Ladder 100 pb (Promega); canaletas 3 a 11 (em verde): amostras de referência; canaletas 15 a 28 (em marrom): amostras brasileiras isoladas em plantéis avícolas do estado de Minas Gerais.

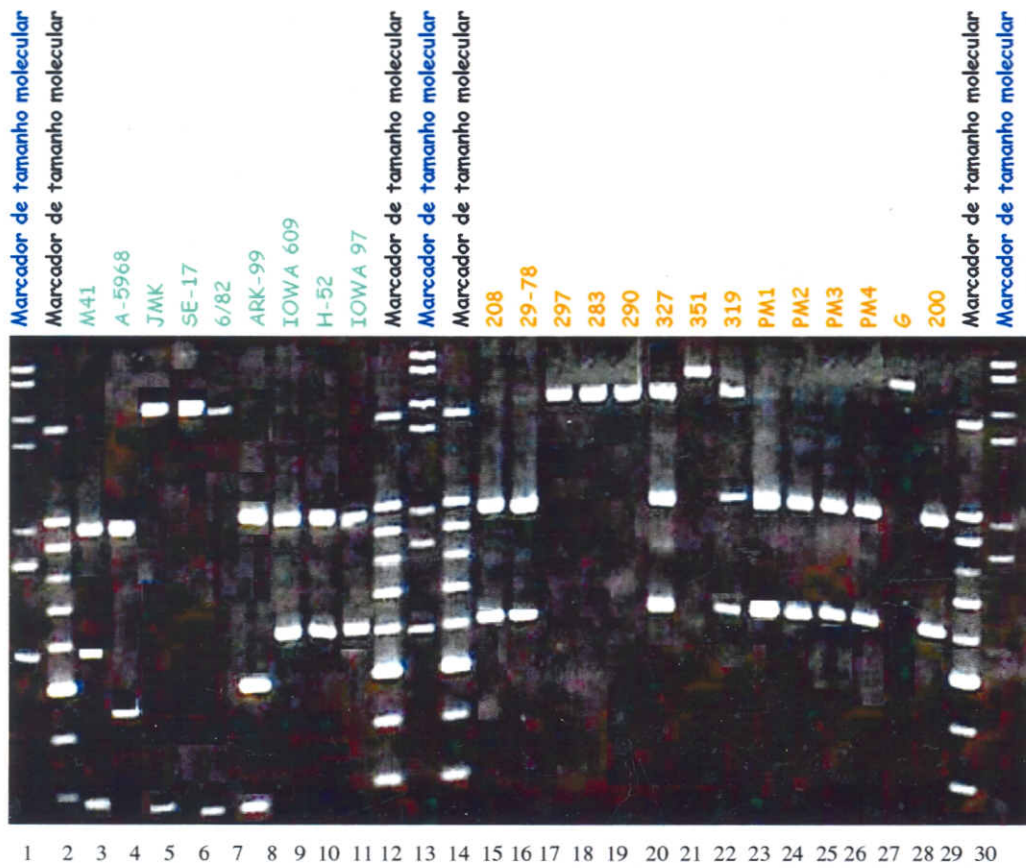


Figura 9 - Perfil de restrição enzimática em gel de agarose 2% (corado por brometo de etídio) dos produtos amplificados (gene S1 do VBIg das amostras de referência e dos isolados virais) por RT-PCR e digeridos com *Xcm*I. Canaletas 1, 13 e 30 (em azul): marcador de tamanho molecular Lambda DNA/*Eco*RI + *Hind*III (Promega); canaletas 2, 12, 14 e 29 (em preto): marcador de tamanho molecular DNA Ladder 100 pb (Promega); canaletas 3 a 11 (em verde): amostras de referência; canaletas 15 a 28 (em marrom): amostras brasileiras isoladas em plantéis avícolas do estado de Minas Gerais.

Nas figuras referentes às digestões enzimáticas, as bandas correspondentes aos fragmentos menores que 200 pb não puderam ser vistas, embora as mesmas tenham sido observadas nas fotografias originais, ainda que fracas.

Pode-se verificar variação na intensidade de algumas bandas. Tal variação pode ser, provavelmente, devida às diferentes concentrações de DNA observadas nas amostras de referência e nos isolados de VBIG analisados.

Embora os géis de poliacrilamida possam ser até cem vezes mais sensíveis que géis de agarose na detecção de bandas produzidas por PCR (SANGUINETTI *et al.*, 1994) nossos resultados, quando comparados à eletroforese em gel de agarose, foram semelhantes (dados não apresentados).

Os tamanhos moleculares dos fragmentos obtidos de seqüências publicadas no *GenBank* de

algumas amostras de referência digeridas com as enzimas *Bst*YI, *Hae*III e *Xcm*I estão mostrados na Tabela 10. As amostras de referência, utilizadas neste estudo, apresentaram o número e dimensões dos fragmentos previstos na literatura para as digestões enzimáticas realizadas, conferindo alto grau de confiabilidade aos resultados deste trabalho. Além disso, os testes de restrição enzimática foram úteis por comprovarem a especificidade das ampliações obtidas por PCR. Os pesos moleculares dos fragmentos obtidos após a RFLP do gene S1 amplificado dos isolados de campo do VBIG não foram determinados, uma vez que as diferenças entre isolados de campo são geralmente grandes, sem necessidade da determinação exata dos pesos moleculares (IKUTA, 2000). A Tabela 10 e a Figura 10 resumem os fragmentos de restrição enzimática obtidos com amostras de referência, na ordem crescente de tamanho e não na posição 5' → 3'. Os padrões de RFLP obtidos utilizando as três enzimas de restrição foram comparados isoladamente para cada enzima (resultados não mostrados) e também simultaneamente (Figura 11).

Tabela 10 – Tamanhos dos fragmentos (pb) das amostras de referência do vírus da bronquite infecciosa das galinhas (VBIG) com seqüências depositadas no *GenBank* obtidos pelas enzimas de restrição

Amostras de Referência	Enzima de restrição		
	<i>Bst</i> YI	<i>Hae</i> III	<i>Xcm</i> I
M41 (1720 pb)	200	333	172
	487	481	587
	1033	906	961
JMK (1738 pb)	687	333	172
	1051	457	1566
		948	
SE-17 (1679 pb)	687	108	110
	992	210	1564
		1361	
UK 6/82 (1719 pb)	NC ¹	645	168
		1074	1551
		130	129
ARK-99 (1738 pb)	418	170	172
	636	210	479
	684	1228	958

¹ NC – Não cliva

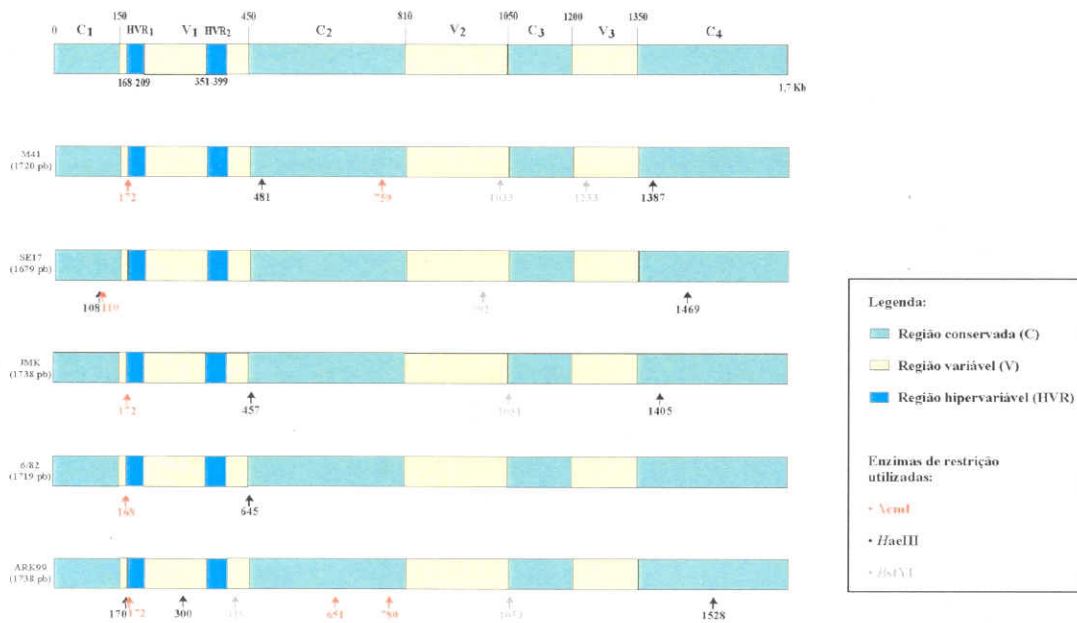


Figura 10 – Mapas de restrição do gene amplificado (S1) das amostras de referência (M41, SE-17, JMK, 6/82, ARK-99) digerido com as enzimas *BstYI*, *HaeIII* e *XcmI*. As seqüências nucleotídicas foram obtidas em banco de dados (*GenBank*). As digestões enzimáticas foram realizadas utilizando o programa *WebGene* (site: <<http://darwin.bio.geneseo.edu/~yin/WebGene/RE.html>>). Os sítios de restrição da enzima *BstYI* estão mostrados em cinza, os da enzima *HaeIII* em vermelho e os da enzima *XcmI* em preto.

As análises com enzimas de restrição devem ser muito criteriosas e sempre levar em conta o uso de combinações diversas de diferentes enzimas de restrição, escolha de tipos de enzimas de restrição com base na especificidade dos sítios reconhecidos para clivagem, para análise mais compreensiva e representativa que permita interpretar reais variações que possam ser encontradas. Neste caso, é essencial dispor de amostras de referência cujos perfis de restrição sejam conhecidos para as enzimas escolhidas para o estabelecimento dos padrões aos resultados esperados. Há, porém, a possibilidade de se ter amplificado amostras virais com variações significativas na seqüência do gene amplificado por PCR. Portanto, ao definir quais enzimas usar é importante utilizar aquelas que clivam seqüências do DNA que sejam conhecidas como mais conservadas, que mantenham praticamente as mesmas seqüências de ácidos nucleicos entre diferentes amostras isoladas de vírus, mesmo em genes de menor conservação de

seqüências. Neste caso, a enzima *HaeIII* seria a de escolha, caso o estudo por RFLP fosse realizado apenas com uma enzima de restrição, por se tratar de enzima que cliva em regiões mais conservadas de S1.

Conforme esperado (KWON *et al.*, 1993) as amostras M41 e A5968 foram diferenciadas entre si pelo uso da enzima de restrição *XcmI*. M41 e H-52 foram mantidas em mesmo grupo, independente da enzima de restrição utilizada; já as amostras SE-17, 6/82 e ARK-99 ficaram isoladas em grupos diferentes. As amostras I-609 e I-97 ficaram juntas, em grupo separado, porém quando a digestão enzimática foi realizada com a enzima *XcmI*, elas foram agrupadas com as amostras de referência M41 e H-52.

Os resultados indicaram perfis de restrição diferentes entre algumas amostras de referência e

os isolados virais estudados. Diferentes perfis de restrição são também observados entre isolados de VBIG de diferentes países (KWON *et al.*, 1993; WANG & TSAI, 1996; WANG *et al.*, 1996).

Uma vez que os isolados de VBIG foram divididos em vários perfis de restrição é improvável que os isolados do VBIG, no estado de Minas Gerais, tenham evoluído da mesma origem. Entretanto, a natureza desta evolução é totalmente desconhecida e deve ser mais bem estudada. Para isto, faz-se necessária a tipificação de outros isolados de VBIG, provenientes de outras regiões, inclusive de fora do país, por RT-PCR/RFLP com os mesmos

oligonucleotídeos utilizados para que eles possam ser comparados com os isolados deste estudo.

Embora tenham sido estabelecidas diferenças nos perfis de RFLPs, entre as amostras, detectou-se menor variabilidade genética com as enzimas *Bst*YI e *Xcm*I. Quando se utilizou a enzima *Hae*III, maior diversidade genética foi verificada entre os isolados nefropatogênicos, sendo o isolado 283 (quadro respiratório e síndrome nefrite-nefrose) colocado em grupo separado dos isolados 290 e 297 (quadro respiratório).

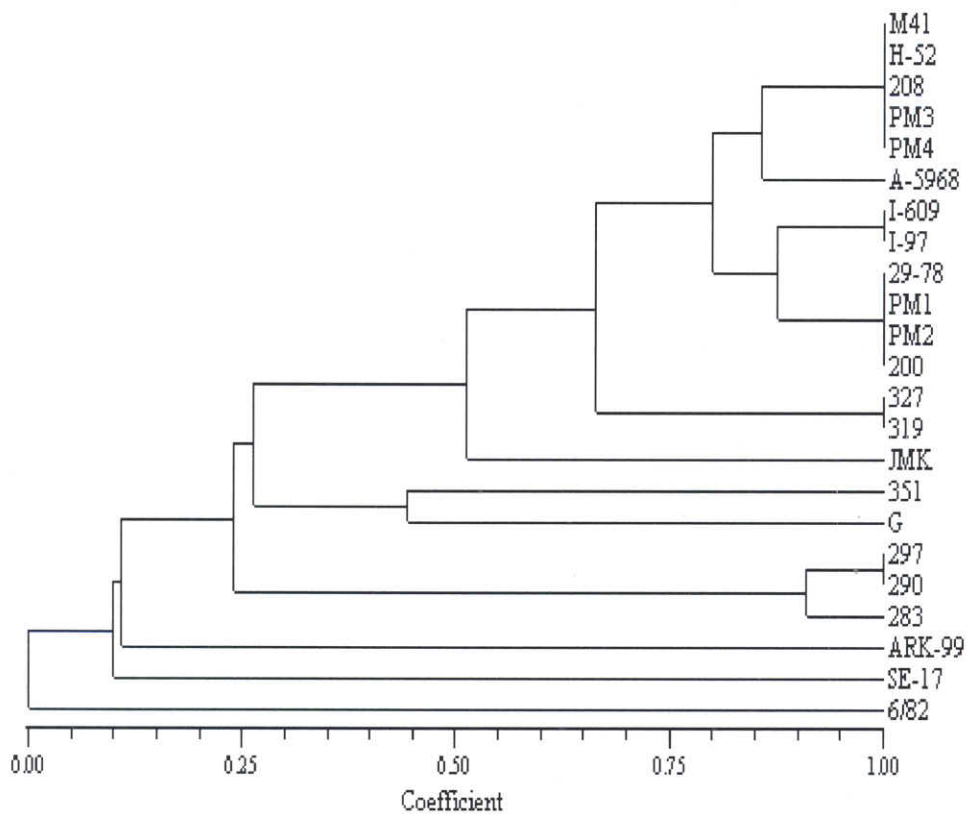


Figura 11 - Fenograma construído pelo *software* NTSYS a partir dos resultados da digestão enzimática de nove amostras de referência e de 14 isolados do vírus da bronquite infecciosa das galinhas (VBIG) provenientes do estado de Minas Gerais com as enzimas de restrição *Bst*YI, *Hae*III e *Xcm*I.

Ao analisar as características dos quadros clínicos manifestados pelas aves, assim como o ano de isolamento das amostras, observa-se semelhança nesses aspectos em alguns isolados, o que poderia justificar o agrupamento dos isolados desta maneira. Os isolados PM3 e PM4, do mesmo ano (1989), de frangos de corte com problemas respiratórios formaram grupo juntamente com o isolado 208, que é proveniente de poedeiras. Nenhuma relação foi observada entre o isolado 208 e os demais, uma vez que este é o único proveniente de poedeiras. Entre os isolados 29-78, PM1, PM2 e 200 é possível observar semelhança entre o quadro clínico manifestado, todos de caráter respiratório, porém somente dois (PM1 e PM2) mostraram também semelhança entre os anos de isolamento (1987). A julgar por esses isolados e PM3 e PM4, os únicos que se conhece a localização geográfica exata, pode-se verificar que isolados de mesma região são mais próximos geneticamente que isolados de regiões diferentes. Os isolados 327 e 319, ambos de 1983, a partir de aves com síndrome nefrite-nefrose, também foram colocados em mesmo grupo. Por outro lado, os isolados 351 e 283 apesar de apresentarem características semelhantes aos anteriores permaneceram cada um em grupo separado, corroborando dados encontrados por WANG & HUANG (2000) de que sorotipo/genotipo não necessariamente corresponde a patotipo.

Neste estudo, verificou-se que dos 14 isolados de VBIG, três (21,43%) foram semelhantes às amostras pertencentes ao sorotipo Massachusetts. Este sorotipo é ainda largamente utilizado como vacina (viva e/ou inativada) no Brasil. Os isolados de VBIG foram obtidos tanto de plantéis vacinados quanto não vacinados, havendo, portanto a possibilidade de que alguns deles (208, PM3 e PM4) tenham sido re-isolados de amostras vacinais, pois os perfis de RFLP desses isolados foram semelhantes aos perfis de RFLP da amostra vacinal H-52 e somente o seqüenciamento poderá elucidar a questão (JIA *et al.*, 1995).

As variações do VBIG podem, também, ser atribuídas à recombinação após a co-infecção com duas amostras distintas (WANG *et al.*, 1993). Vários pesquisadores têm caracterizado isolados de surtos de BIG e mostrado que estes podem ter forte relação com amostras vacinais, sugerindo que os isolados prevalentes em uma região

possam ter surgido pela recombinação de amostras vacinais vivas (WANG *et al.*, 1993) ou de amostras vacinais com amostras de campo (JIA *et al.*, 1995).

Nossa observação foi que a maioria dos isolados (11/14) não se apresentou semelhante às amostras de referência estudadas, incluindo a amostra vacinal, o que sugere que eles não são derivados de vacinas vivas atenuadas e podem, portanto, ser considerados como variantes, pelo menos no tocante ao gene S1 estudado. Os dados apresentados indicam que diferentes amostras do VBIG estiveram e ainda podem estar co-circulando em Minas Gerais, podendo-se concluir que a combinação de testes sorológicos e moleculares deva ser utilizada para a caracterização destas amostras. A existência de amostras variantes dentre as estudadas sugere que as vacinas utilizadas (sorotipo Massachusetts) não fornecem proteção adequada contra estas amostras autóctones. A identificação de novos sorotipos ou amostras variantes do VBIG em determinada área geográfica pode ser utilizada para modificar os programas de vacinação para o fornecimento de maior proteção contra sorotipos enzoóticos.

Pelos resultados obtidos neste estudo, pode-se verificar que a porcentagem de isolados de VBIG relacionados geneticamente ao sorotipo Massachusetts no estado de Minas Gerais (21%) foi semelhante à porcentagem obtida por KWON *et al.* (1993): dentre 20 isolados estudados, 4 (20%) do referido sorotipo.

Nossos resultados mostraram que a técnica escolhida foi capaz de diferenciar as amostras de VBIG utilizadas, agrupando-as em diferentes grupos. Sem dúvida alguma, a descoberta das enzimas de restrição, em 1970, foi a grande chave para o desenvolvimento da Engenharia Genética. A análise por RFLP utilizada neste estudo mostrou ser ferramenta na detecção de polimorfismos entre isolados do VBIG de diferentes localidades em Minas Gerais. Uma vez que a maioria dos isolados apresentou-se diferente das amostras de referência utilizadas, torna-se necessária a inclusão de mais amostras de referência do VBIG para verificar se algum isolado apresenta padrão de bandejamento semelhante a amostras de referência representativas de outros sorotipos conhecidos do vírus.

RT-PCR/RFLP mostrou ser método adequado para classificar novos isolados. Uma vez que, neste estudo, a maioria dos isolados mostrou ser diferente da amostra vacinal utilizada (H-52) poderia ser necessário desenvolver vacina local para controlar a infecção. Os dados obtidos demonstraram que a técnica de RT-PCR/RFLP é importante instrumento na análise da variabilidade genética dos organismos.

Os padrões gerados pela técnica de RFLP, por revelarem características intrínsecas do genoma do organismo, não sendo influenciados por condições ambientais e de hospedeiros, permitem uma caracterização mais detalhada do VBIg.

É importante ressaltar, pois, alguns pontos fundamentais ao bom emprego da técnica. O primeiro diz respeito à qualidade do DNA utilizado. A utilização de DNA de alta qualidade (puro e não degradado) é essencial ao sucesso da técnica de RFLP. O isolamento e a purificação do DNA são pontos cruciais para a maioria dos protocolos em biologia molecular. Os produtos de PCR freqüentemente requerem purificação caso a detecção não seja o único objetivo. O objetivo de qualquer procedimento de purificação é a remoção de outros componentes da reação, tais como proteína (BSA, DNA polimerase), dNTPs residuais, *primer-dimer* e outros produtos de amplificação inespecíficos. A purificação do DNA amplificado é pré-requisito para a digestão enzimática. O método de purificação de DNA utilizado neste estudo mostrou-se eficaz a julgar pelos resultados obtidos.

De posse de DNA de boa qualidade, o próximo passo relaciona-se à digestão do mesmo para a obtenção dos fragmentos. A técnica de RFLP baseia-se nas diferenças de comprimento destes fragmentos. Um ingrediente chave da técnica de RFLP é a utilização de enzimas de restrição na fragmentação do DNA. Para se clivar as amostras de DNA utilizadas na análise, as condições de uso da enzima escolhida devem ser bem conhecidas. Por definição, uma unidade de enzima é a quantidade de enzima necessária para digerir 1 µg de DNA – padrão (como o de *lambda* fago) em uma hora. A digestão completa do DNA é condição fundamental para análise de RFLP. Se não ocorrer, polimorfismo pode ser observado em situações em que não seria se a digestão fosse completa, confundindo a análise.

Portanto, neste estudo, utilizou-se maior número de unidades de enzima para digerir as amostras do que o definido para DNA – padrão. Excesso de enzima foi adicionado para se evitar digestão parcial do DNA. A determinação da quantidade de enzima (unidades) para quantidade de DNA utilizada na digestão foi feita empiricamente. A mistura (coquetel) foi preparada contendo todos os reagentes necessários à digestão do DNA, evitando-se que estes reagentes fossem adicionados um a um ao DNA de cada amostra. Isto economizou bastante tempo e esforço, além de tornar as pipetagens mais acuradas, evitando-se volumes muito pequenos.

Contudo, nem toda a técnica de diagnóstico é perfeita. Esta análise deve levar em consideração importantes aspectos, como o fato de única mutação, ou seja, a variação de único nucleotídeo no DNA poder abolir um sítio de clivagem e alterar o perfil de restrição do DNA, sem, contudo, refletir na alteração da proteína e, portanto, não causando variação antigênica.

Embora a análise de restrição seja capaz de revelar polimorfismos distribuídos em toda a extensão do gene, esta técnica apresenta limitações relacionadas à capacidade de detecção do número real de diferenças de nucleotídeos presentes em determinado segmento.

A classificação de isolados do VBIg por RT-PCR utilizando oligonucleotídeos sorotipo-específicos do gene desenhados para o gene S1 oferece procedimento alternativo à análise por RFLP. Estas duas técnicas geralmente fornecem o mesmo resultado quando realizadas nos mesmos isolados de VBIg (KEELER *et al.*, 1998). Quando os resultados destes dois procedimentos são discordantes é necessária a combinação de técnicas moleculares com a análise por VN para determinar a verdadeira identidade dos isolados de VBIg.

Apesar do sucesso, a técnica de RFLP para a identificação de sorotipos do VBIg pode apresentar desvantagens. Os perfis de restrição obtidos por RFLP de alguns sorotipos do VBIg dificilmente serem diferenciados de outros sorotipos não relacionados. Além disso, isolados contendo misturas de mais de um sorotipo do VBIg podem ser difíceis de diferenciar (KEELER *et al.*, 1998).

Em trabalhos anteriores realizados no Setor de Doenças das Aves da EV/UFGM, verificou-se que a grande maioria das amostras examinadas não se relacionou antígenicamente com M41 (SOUZA, 1999). Os resultados indicaram que há diferenças detectáveis por anticorpos monoclonais entre amostras de VBIG que, apesar de não poderem ser interpretadas como diversidade sorológica, podem servir de alerta. O predomínio da diversidade entre amostras locais de VBIG pode espelhar as falhas ou insucessos que têm sido observados nos programas de vacinação.

O método utilizado neste estudo permitiu a classificação de isolados do VBIG de acordo com similaridades gênicas, como indicado pelos perfis de restrição. Atenção especial deve ser dada ao utilizar este método para representar relações filogenéticas ou genealógicas. Adições, deleções e substituições de nucleotídeos nem sempre resultam em mudanças nos sítios de restrição e, sendo assim, os perfis de restrição nem sempre são sensíveis a simples mudanças genéticas. Entretanto, o uso de várias enzimas de restrição poderia melhorar a sensibilidade a mudanças nas seqüências nucleotídicas. A estimativa da distância genética é dependente das enzimas de restrição utilizadas. O emprego de diversas enzimas de restrição, com diferentes sítios, é alternativa que deve ser utilizada para aumentar a habilidade em distinguir diferenças e similaridades entre isolados de vírus.

A possibilidade de que fragmentos de restrição de tamanhos semelhantes possuam composição genética diferente deve ser levada em consideração. Além disso, como em qualquer reconstrução de filogenia, os efeitos da seleção natural e artificial (por exemplo, engenharia genética) ao criar grandes diferenças genéticas entre amostras de origem evolucionária comum devem, também, ser observados (WEIGEL & SCHERBA, 1997).

Estes dados estão de acordo com publicações (KWON *et al.*, 1993; WANG & TSAI, 1996; JACKWOOD *et al.*, 1997) que definem RFLP como técnica eficiente para se detectar polimorfismos entre amostras do VBIG.

Em termos de conteúdo de informação, RFLP não fornece a informação detalhada sobre a constituição genômica como o seqüenciamento

de nucleotídeos. Entretanto, até mesmo para vírus (com seu limitado material genético), os custos de seqüenciamento da amostra podem ser proibitivos. Então, na impossibilidade de seqüenciamento de nucleotídeos, RFLP fornece dados para determinar a similaridade genética entre organismos. Com a sua sensibilidade melhorada para diferenças genéticas (melhorada com o uso de múltiplas enzimas de restrição), a análise por RFLP pode continuar a ser método relativamente barato, preciso e biologicamente válido para determinar similaridade genômica.

Este trabalho demonstrou ser possível a detecção da variabilidade genética entre as amostras do VBIG, pela técnica de RT-PCR/RFLP, abrindo perspectivas para análises genéticas de populações e identificação de marcadores genéticos para estes vírus.

Os resultados foram confirmados por seqüenciamento e demonstram a utilidade desta técnica para o diagnóstico diferencial de amostras de VBIG do campo.

3.3 Seqüenciamento Parcial do Gene S1 de Isolados do Vírus da Bronquite Infecciosa das Galinhas (VBIG) no Estado de Minas Gerais – Brasil

3.3.1 Introdução

A mais importante propriedade da molécula de DNA é a sua seqüência nucleotídica. Até o final dos anos 70, obter-se a seqüência de um ácido nucleico era difícil e muito laborioso. O desenvolvimento de duas novas técnicas, em 1977, uma por ALAN MAXAM e WALTER GILBERT (MAXAM & GILBERT, 1977) e outra por FREDERICK SANGER e colaboradores (SANGER *et al.*, 1977), tornou possível seqüenciar moléculas de DNA cada vez maiores, com facilidade não imaginada algumas décadas atrás.

O seqüenciamento de DNA é o método mais sensível e informativo para a detecção de alterações na seqüência de nucleotídeos. A seqüência de bases presentes no material genético de qualquer organismo armazena toda a informação genética necessária para a vida.

Os coronavírus, como outros vírus RNA, apresentam alta frequência de mutações, com grande diversidade genotípica e fenotípica, que favorece sua rápida evolução. Estudos filogenéticos, baseados em seqüências de genes virais, têm se mostrado importante ferramenta, propiciando o melhor entendimento da evolução e epidemiologia de agentes infecciosos (BOURHY *et al.*, 1995). Métodos de inferência filogenética e análises de resultados filogenéticos certamente continuarão a melhorar. Entretanto, a filogenia molecular já constitui importante forma de descobrir a evolução dos patógenos. Mais que outras metodologias, a análise filogenética de seqüências de nucleotídeos e/ou aminoácidos fornece informação sobre a origem, disseminação e manutenção das infecções (BOURHY *et al.*, 1995).

A análise computacional da seqüência do gene S1 do VBIG pode também ser utilizada para identificar o genótipo do vírus. O primeiro terço do gene S1 contém regiões hipervariáveis que têm sido correlacionadas com o sorotipo. Neste caso, a seqüência nucleotídica do gene S1 nesta região pode ser utilizada para agrupar o VBIG pelo genótipo, que por sua vez, correlaciona com o sorotipo (WANG & HUANG, 2000). Nesta região as seqüências mostram alto grau de variabilidade entre diferentes sorotipos, mas são relativamente conservadas entre amostras do mesmo sorotipo (KUSTERS *et al.*, 1989). Epitopos de S1 envolvidos na neutralização são codificados por seqüências nesta região hipervariável (CAVANAGH *et al.*, 1988; KANT *et al.*, 1992). Basicamente, a RT-PCR é utilizada para amplificar o gene S1 e o seqüenciamento direto do produto de PCR é conduzido para obter os dados para a análise computacional.

Baseado nisto, este estudo teve como objetivo estabelecer a similaridade nas seqüências nucleotídicas entre 12 isolados de VBIG, com base nas seqüências da HVR 1 do gene S1, comparando com as seqüências gênicas de amostras de referência depositadas em banco de dados (*GenBank*).

3.3.2 Material e métodos

Purificação das bandas correspondentes aos produtos de PCR

Oitenta microlitros do produto amplificado de cada amostra foram misturados a 16 µL de tampão de amostra [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] e submetidos a eletroforese em gel de agarose *low melting* 1,5% (p/v) (livre de DNase, Sigma, EUA), nas dimensões de 3 mm de espessura e 20 X 25 cm (largura X comprimento) em tampão de corrida TBE 0,5X. Foram necessárias quatro canaletas do gel/amostra, cada uma contendo 20 µL da mistura de DNA amplificado + tampão de amostra. A corrida foi realizada em TA, voltagem constante (100 V), com duração de 4 h e 25 min, num aparelho de eletroforese Horizon 20 • 25 (BRL, EUA). Imediatamente após a corrida, o gel foi corado com EtBr, de forma a se obter uma concentração final de 0,5 µg/mL, durante 30 min, em ambiente escuro. Para a determinação do tamanho dos produtos de PCR incluiu-se em cada corrida o marcador de tamanho molecular *Lambda* DNA digerido com as enzimas *Eco*RI e *Hind*III (1 µL/canaleta – Promega, EUA).

Durante a observação dos produtos em gel de agarose *low melting* 1,5%, com auxílio de luz UV de mão (302 nm), as bandas específicas do DNA foram recortadas, o mais rapidamente possível para minimizar a exposição do DNA aos raios UV e colocadas em tubos de microcentrifuga de 1,5 mL revestidos com papel alumínio e armazenadas em *freezer* (-20°C) até o momento de serem utilizadas para a purificação. As purificações foram realizadas utilizando-se o “kit” WIZARD™ PCR Preps DNA Purification System (Cat. # A7170 – Promega, EUA). A utilização deste “kit” obedeceu ao protocolo indicado pelo fabricante, com as seguintes modificações: no passo final, o DNA retido na mini coluna foi reconstituído em 50 µL de água ultrapura isenta de DNase, estéril, aquecida a 56°C (modificado), permanecendo em repouso por aproximadamente um minuto, sendo, em seguida, centrifugado durante um minuto (modificado) a 10.000 x g para eluir o fragmento de DNA. Após a purificação, as amostras foram concentradas em *speed vacuum* (Centrivap Concentrator/LABCONCO, EUA) a 60°C durante 10 min ou até que o seu volume chegasse a aproximadamente 15 µL.

Análise dos produtos purificados – eletroforese

A eletroforese dos produtos purificados é importante para verificar a presença da banda específica de DNA após a purificação. Esta etapa apresentou os mesmos passos e reagentes utilizados em (estudo anterior) com modificações nos volumes utilizados. 3 µL de cada produto purificado foram misturados a 12 µL de tampão TBE (Tris-borato-EDTA) 0,5X (BRL, EUA) [100 mM Tris-base; 2,0 mM de solução 0,5 M EDTA (pH 8,0) e 50 mM ácido bórico anidro] e 3 µL de tampão de amostra [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] e submetidos a eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) (livre de DNase, Sigma, EUA), nas dimensões de 3 mm de espessura e 20 X 25 cm (largura X comprimento) em tampão de corrida TBE 0,5X. A corrida foi realizada em TA, voltagem constante (100 V), em aparelho de eletroforese Horizon 20 • 25 (BRL, EUA). Imediatamente após a corrida, o gel foi corado com EtBr, de forma a se obter concentração final de 0,5 µg/mL, durante 30 min, em ambiente escuro. O DNA amplificado foi detectado utilizando-se transiluminador ultravioleta (302 nm – Macrovue™, Hoefer/Pharmacia, EUA). Para a determinação do tamanho dos produtos de PCR incluiu-se em cada corrida o marcador de tamanho molecular *Lambda* DNA digerido com as enzimas *EcoRI* e *HindIII* (1 µL/canaleta – Promega, EUA), com fragmentos variando entre 125 e 21.226 pb.

Seqüenciamento parcial do gene S1 dos isolados virais

O seqüenciamento parcial dos isolados virais foi realizado gentilmente pelo Dr. John Lester em seqüenciador automático (*Applied Biosystems 3700 capillary DNA sequencer*). Para as reações foram utilizados kits *Big Dye Terminator*. Os seqüenciamentos foram realizados apenas com o oligonucleotídeo NEWSIOLIGO5' (senso positivo), sendo geradas três seqüências senso para cada isolado viral a fim de evitar ambigüidades. Dos 14 isolados virais enviados para o seqüenciamento, dois (29-78 e 283) não

apresentaram resultados satisfatórios, sendo, portanto, excluídos das análises subseqüentes.

Análise computacional das seqüências nucleotídicas

Os cromatogramas obtidos foram observados utilizando o software Chromas versão 2,0 beta (Technelysium Pty. Ltd.) obtido pelo web-site <<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>>. Após a obtenção das seqüências de DNA, estas foram comparadas àquelas depositadas no banco de dados do “*National Center for Biotechnology Information*” (NCBI – Bethesda – EUA – <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>>). Para a procura de homologia das seqüências nucleotídicas foi utilizado o banco de dados BLAST N (ALTSCHUL *et al.*, 1997). Os valores de corte utilizados foram os seguintes: para se considerar um gene identificado devido a sua alta homologia com alguma seqüência já depositada neste banco de dados, este deveria apresentar um valor de “score” maior que 100 e um valor de P (Probabilidade) menor que 0,005, ou valor de P menor que 10⁻⁵ independentemente do valor de “score”. Para as análises de alinhamento entre seqüências nucleotídicas foi utilizado o programa MAP (*Multiple Sequence Alignment*) no site do BCM Search Launcher <<http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/SearchLauncher/>>. Foram utilizadas algumas seqüências que estão depositadas no BLAST N, com a finalidade de compor e enriquecer as análises de alinhamento. Neste caso, foram escolhidas as seqüências de amostras padrão, depositadas no NCBI. Os isolados de VBIG foram, a princípio, alinhados tomando por base a amostra de referência padrão M41. Foram utilizados 862 nucleotídeos (nt 65 – 926), a partir da seqüência inicial do gene S1. Um segundo alinhamento foi realizado levando em consideração somente a HVR 1 do gene codificador da proteína S1, utilizando 163 nt (nt 65 a 227).

Após o alinhamento das seqüências obtidas com as seqüências depositadas em banco de dados, estas foram utilizadas para a construção de fenogramas utilizando-se o método de *Neighbor-joining* usando o programa TREECON for Windows (VAN DER PEER & WACHTER, 1994).

Para testar o grau de confiabilidade dos agrupamentos obtidos nas árvores fenéticas, utilizamos o programa *Treecon* e submetemos os

dados ao teste de *Bootstrap* com 100 reamostragens. O *Bootstrap* envolve substituição aleatória de dados, de forma a criar uma série de conjuntos de dados diferentes, mas mantendo o mesmo tamanho do conjunto de dados original.

3.3.3 Resultados e discussão

A qualidade da seqüência de DNA depende criticamente da qualidade do material inicial. Em se tratando dos produtos de PCR é obrigatório otimizar as condições da reação para obter um produto de amplificação homogêneo. Neste estudo, a otimização não produziu apenas um produto amplificado a exemplo do ocorrido no trabalho original e base desta tese (KWON *et al.*, 1993). Por esta razão, os produtos amplificados individuais tiveram que ser purificados a partir da eletroforese em gel de agarose *low melting* 1,5%. O processo de purificação foi etapa importante, pois apenas os produtos de tamanho esperado (1,7 Kb) foram submetidos ao seqüenciamento.

Quando comparadas às seqüências disponíveis no *GenBank*, as seqüências obtidas neste estudo mostraram homologia significativa somente com genes do VBIG, correspondendo à parte estudada do gene da glicoproteína S1.

As seqüências nucleotídicas geradas pelo seqüenciamento automático foram alinhadas e

analisadas com *software* para determinar a sua relação com as seqüências nucleotídicas de S1 depositadas no *GenBank*. Foram observadas diferenças de tamanho entre as seqüências antes que estas fossem alinhadas e que levaram à introdução de lacunas para permitir o perfeito alinhamento das seqüências. Estas diferenças podem ser atribuídas à presença de inserções e/ou deleções que ocorrem durante o processo de evolução das espécies.

Os dois métodos de agrupamento genético realizados com os 12 isolados do VBIG (um baseado em 862 nucleotídeos sequenciados do gene S1 e, outro, baseado apenas na HVR 1 do gene codificador da proteína S1) resultaram em agrupamentos semelhantes, conforme pode ser observado nas Figuras 12 e 13. No entanto, o segundo agrupamento mostrou fenograma com melhor definição, sendo possível a observação de dois grupos bem distintos. Neste caso, optou-se por trabalhar, a partir de então, somente com a HVR I, conforme WANG & HUANG (2000), de todos os isolados e amostras de referência do VBIG, inclusive as com seqüências completas depositadas no *GenBank*, pela facilidade de se trabalhar com seqüências nucleotídicas menores. Nesses fenogramas, além dos agrupamentos obtidos, observam-se os valores de *Bootstrap* que indicam o percentual de suporte, calculado pelo teste, às relações filogenéticas apresentadas.

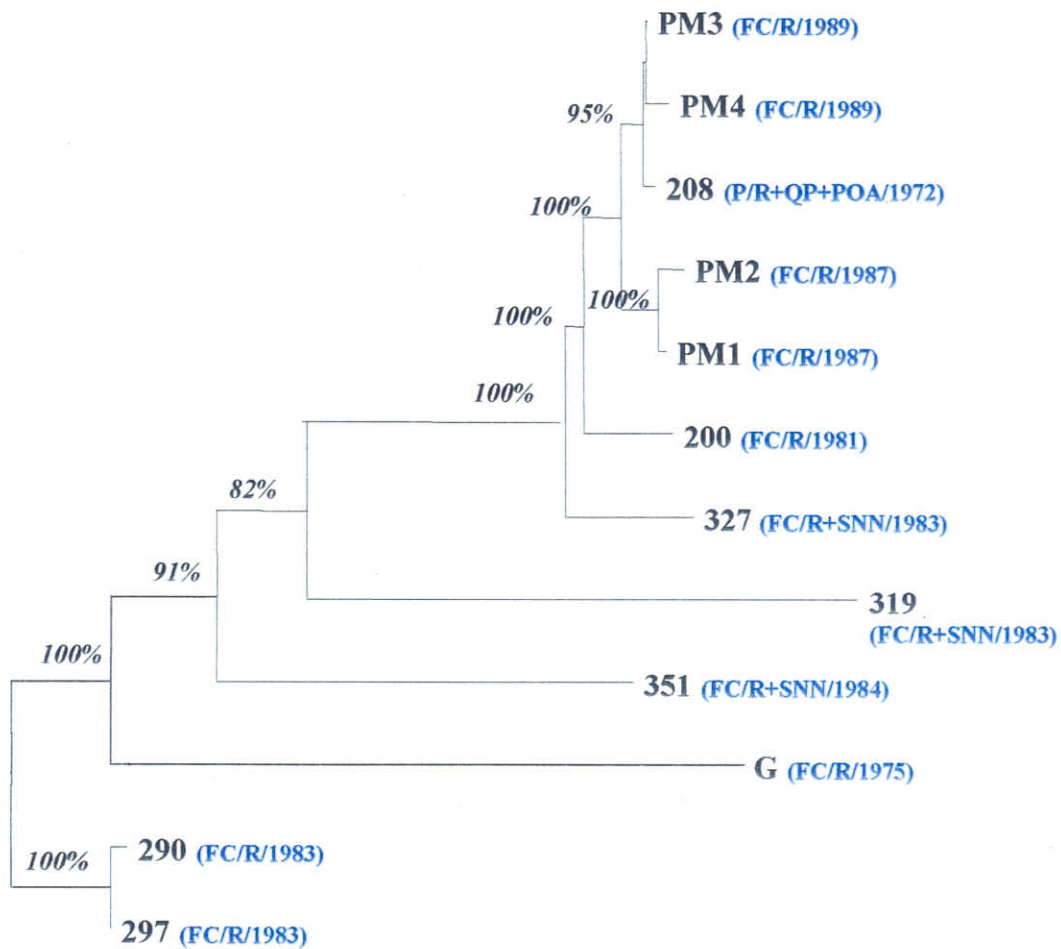


Figura 12 – Árvore filogenética construída pelo programa *Treecon*, a partir do alinhamento das seqüências nucleotídicas (862 nt) obtidas do gene codificador da glicoproteína S1 dos isolados do vírus da bronquite infecciosa das galinhas (VBIG) utilizados neste estudo. Ao lado da identificação de cada amostra verifica-se, nesta ordem, o tipo de criação/sinais clínicos observados no surto/ano de isolamento. Os números nos nodos representam o percentual de *Bootstrap*.

Tipo de criação: FC – frango de corte; P – poedeira

Quadro clínico: R – respiratório; QP – queda de postura; POA – postura de ovos anormais.

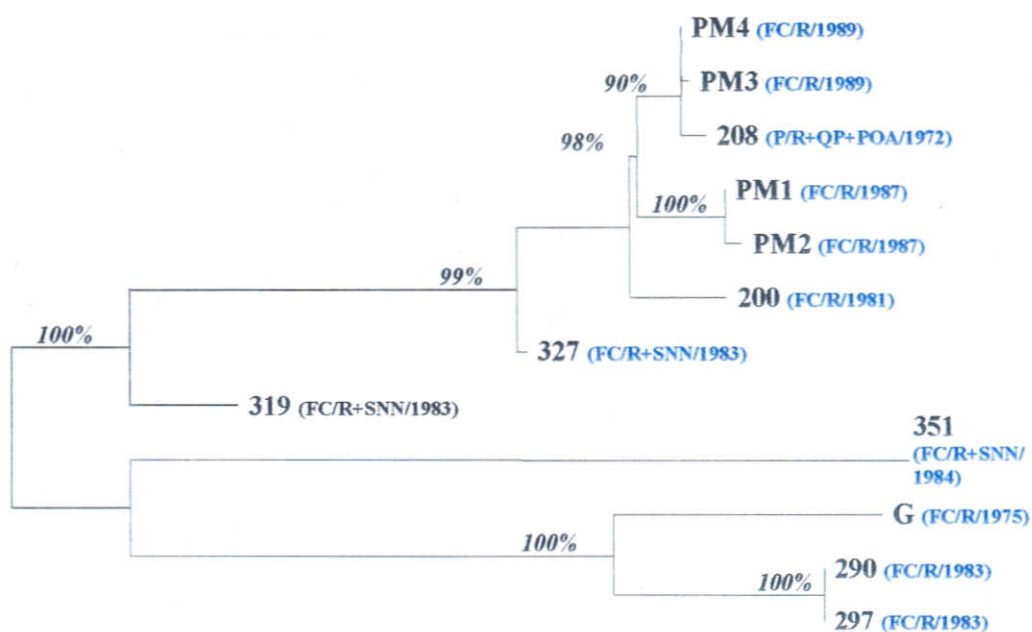


Figura 13 – Árvore filogenética construída pelo programa *Treecon*, a partir do alinhamento das seqüências nucleotídicas da região hipervariável 1 (HVR1), do gene codificador da glicoproteína S1 dos isolados do vírus da bronquite infecciosa das galinhas (VBIG) utilizados neste estudo. Ao lado da identificação de cada amostra verifica-se, nesta ordem, o tipo de criação/sinais clínicos observados no surto/ano de isolamento. Os números nos nodos representam o percentual de *Bootstrap*.

Tipo de criação: FC – frango de corte; P – poedeira

Quadro clínico: R – respiratório; QP – queda de postura; POA – postura de ovos anormais.

O seqüenciamento foi capaz de distinguir diferentes grupos de isolados de campo. Os resultados deste estudo ilustram alta variação genética na área de alta concentração avícola onde a vacinação contra o VBIG tem sido utilizada. A determinação de seqüências em regiões onde a doença é possivelmente endêmica pode levar a caracterização de subtipos, auxiliando a epidemiologia no monitoramento de surtos.

O conhecimento das seqüências do gene S1 das amostras circulantes no Brasil é de grande importância para que se possa caracterizar molecularmente os isolados brasileiros.

Os resultados obtidos do seqüenciamento do gene S1 da glicoproteína da espícula sugeriram que houve variação entre alguns isolados do

VBIG deste trabalho, os quais são cronológica e geograficamente distintos. Comparando estes isolados de VBIG com os de outras regiões do mundo (Austrália, Estados Unidos, Reino Unido, Nova Zelândia, China, Israel), verificou-se que os isolados de VBIG deste estudo formaram grupo diferente de todos os descritos (dados não apresentados). Os resultados obtidos confirmam a existência de amostras de VBIG geneticamente distintas de isolados de outras regiões. Publicações anteriores (JOHNSON *et al.*, 1972; JOHNSON *et al.*, 1973) mostraram que amostras do VBIG responsáveis pela doença em várias regiões dos Estados Unidos podem ser restritas a uma região particular. No entanto, MOORE *et al.* (1998) observaram que variantes iguais podem circular em áreas avícolas isoladas geograficamente. No Brasil, LUNGE *et al.* (1998) verificaram que os isolados brasileiros

apresentaram seqüências nucleotídicas dos genes codificadores do nucleocapsídeo e da proteína S1 semelhantes entre si, porém significativamente distintas das amostras vacinais do sorotipo Massachusetts e isolados de referência norte-americanos. Além disso, também analisaram comparativamente seqüências destes mesmos genes de amostras de VBIg da Europa e de outros locais do mundo (publicadas no *GenBank*) demonstrando que os isolados estudados e denominados variantes por eles, seriam diferentes de todos os descritos.

Estudos mais amplos de seqüenciamento de amostras do VBIg isoladas no Brasil devem ser efetuados para verificar a existência de diferenças em regiões genômicas menos conservadas, mas também responsáveis pela expressão de proteínas importantes para o mecanismo viral. Isto pode ser muito interessante no atual momento em que vacinas vêm sendo colocadas no mercado brasileiro. Estas vacinas baseiam-se em amostras virais isoladas em outras partes do mundo, não havendo nenhuma garantia de proteção em relação às amostras virais presentemente encontradas no Brasil.

Na Figura 14 pode-se observar o agrupamento dos isolados de VBIg com as amostras de referência utilizadas neste estudo e com seqüências nucleotídicas depositadas no *GenBank*.

Em relação aos isolados de campo, observa-se que PM1, PM2, PM3, PM4, 200 e 208 apresentaram-se semelhantes genotipicamente à

amostra M41, sendo que os isolados PM1, PM2 e 208 em estudo realizado anteriormente por SOUZA (1999) apresentaram afinidade antigênica com a amostra M41. Como na técnica de RFLP, estes isolados virais apresentaram-se divididos em dois subgrupos, sendo o primeiro constituído pelos isolados 208, PM3 e PM4 e o segundo, pelos isolados PM1, PM2 e 200.

É importante ressaltar que as amostras PM1, PM2, PM3 e PM4 são oriundas da mesma região do Estado de Minas Gerais, onde a atividade avícola é intensificada.

A amostra 208 (isolada de poedeiras comerciais) foi, neste estudo e anteriormente (SOUZA, 1999), classificada como pertencente ao sorotipo Massachusetts. No entanto, amostras variantes são mais comuns em poedeiras que em frangos de corte (ALEXANDER & GOUGH, 1977). Diversas práticas de manejo características às poedeiras parecem contribuir para o ambiente mais favorável ao desenvolvimento de "novos sorotipos variantes" (GELB *et al.*, 1991). Existem condições favoráveis para a evolução de novos sorotipos em plantéis de poedeiras densamente povoados, inclusive pressão seletiva da imunidade, produzida por intensivos programas de vacinação, plantéis de múltipla idade para a produção contínua de ovos e falhas na limpeza e desinfecção das instalações. Neste estudo, trabalhou-se apenas com um isolado proveniente de poedeiras, não sendo possível levantar hipóteses em relação a esse aspecto.

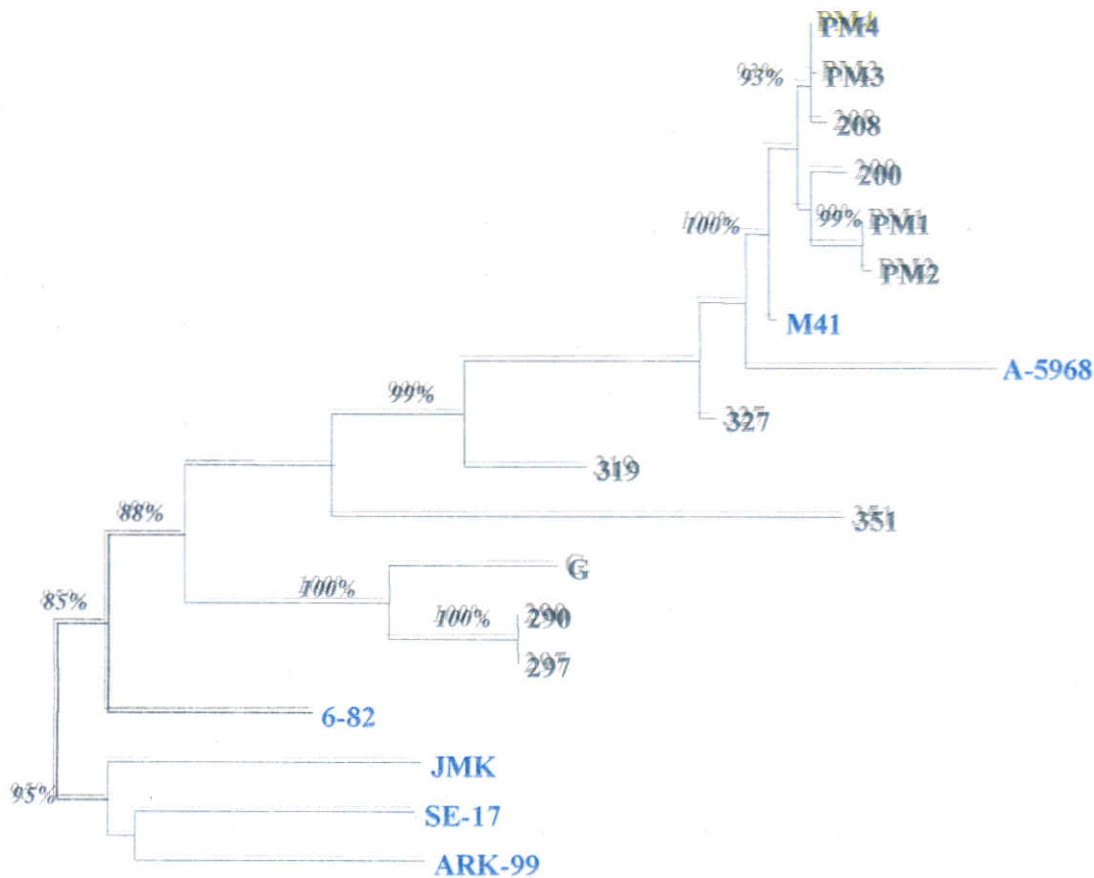


Figura 14 - Árvore filogenética construída pelo programa *Treecon*, a partir do agrupamento das seqüências nucleotídicas da região hipervariável 1 (HVR 1) do gene codificador da glicoproteína S1 dos 12 isolados do vírus da bronquite infecciosa das galinhas (VBIG) e das amostras de referência utilizadas neste estudo com seqüências depositadas no *GenBank*.

O seqüenciamento parcial do gene da glicoproteína da espícula neste estudo revelou que, provavelmente, há alguma relação de ancestralidade entre os isolados 208 e os demais do mesmo grupo (PM3 e PM4); o mesmo não foi observado por CAVANAGH & DAVIS (1992) ao estudarem isolados provenientes de diferentes décadas (60 e 80). A ausência de amostras relacionadas a outros sorotipos diferentes do Massachusetts reforça que, provavelmente, a política do Ministério da Agricultura de liberação apenas do referido sorotipo para vacinação contra o VBIG foi correta.

Os resultados obtidos pelo seqüenciamento parcial dos isolados de VBIG foram semelhantes

àqueles da digestão enzimática. Uma das diferenças que se pode observar em relação a essas duas técnicas moleculares, neste estudo, é em relação às amostras 327 e 319. Na técnica de RFLP estas duas amostras foram semelhantes, sendo agrupadas juntas, porém no seqüenciamento, as mesmas foram colocadas em ramos próximos, mas diferentes. Observa-se, pelo alinhamento das amostras, inserções de três bases na amostra 319 ou deleções, na mesma região, em todos os outros isolados de campo analisados. É mais provável que tenham ocorrido deleções em todos os isolados de VBIG deste estudo com exceção do isolado viral 319, pois a amostra de referência M41, assim como as

demais amostras de referência utilizadas apresentaram essas três bases.

Nas análises filogenéticas foram utilizadas seqüências obtidas por amplificação usando RT-PCR, com oligonucleotídeos definidos com base em seqüência já publicada. Isto impõe certa limitação a esse tipo de estudo, pois parte de um pressuposto (homologia nas seqüências dos oligonucleotídeos) que pode resultar em exclusão de grupos genéticos muito divergentes.

As seqüências obtidas devem ser comparadas a outras seqüências de VBIG obtidas em outras regiões do país. Este estudo comparativo teria por finalidade realizar análises filogenéticas que envolvessem amostragem maior. Certamente, a possibilidade de unir dados com outros grupos de pesquisadores torna o trabalho mais relevante e a contribuição científica torna-se muito mais significativa. As seqüências também serão depositadas em bancos de dados para posteriores análises.

4 CONCLUSÕES

- A aplicação da RT-PCR proposta originalmente por KWON *et al.* (1993) e otimizada para a identificação do VBIG pode melhorar o diagnóstico etiológico da BIG nos plantéis avícolas brasileiros.
- Alguns isolados de VBIG estudados apresentaram grande similaridade genética entre si e alto polimorfismo com relação às amostras de referência estudadas;
- A técnica de RFLP foi eficiente na detecção de polimorfismos entre os isolados, sendo de grande aplicabilidade no estudo da variabilidade genética. Os resultados da RFLP puderam ser usados na estimativa de relações de parentesco entre isolados do VBIG.
- O fenograma construído, utilizando-se o método de UPGMA, permitiu, na maioria dos casos, relacionar as posições das amostras no fenograma com os seus anos de isolamentos e manifestações clínicas;
- Os resultados obtidos pelo seqüenciamento dos isolados de VBIG foram semelhantes aos obtidos por RFLP.
- A caracterização genotípica de amostras brasileiras do VBIG neste trabalho, resultou na identificação de amostras variantes.
- Há necessidade de um planejamento imediato para a investigação epidemiológica nacional, a fim de se verificar a presença de outros sorotipos ou variantes. Aliado a isso, deve-se estudar a patogenicidade dos isolados.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O VBIg tem sido controlado pelo uso extensivo de vacinas, mas ainda permanece como grande problema econômico. O constante surgimento de amostras variantes tem desafiado as estratégias de vacinação. Com o advento de técnicas moleculares, pesquisas sobre o VBIg têm sido concentradas em métodos de diagnóstico e diferenciação de amostras. O entendimento da evolução natural dos patógenos é, possivelmente, pré-requisito para a definição da estratégia global de controle. O desenvolvimento de técnicas analíticas rápidas e confiáveis na química e biologia molecular tem levado ao uso crescente de estudos moleculares como ferramenta epidemiológica. Estes estudos geralmente incluem a caracterização de isolados e a identificação de reservatórios em diferentes áreas; neste caso, a evolução genética e geográfica dos microrganismos na natureza pode ser monitorada.

Estes estudos mostraram que as amostras do VBIg isoladas em diferentes regiões do estado de Minas Gerais são geneticamente variantes daqueles isolados de outras regiões do mundo. Acredita-se que dados obtidos de futuros estudos sobre a filogenia de amostras serão poderosa ferramenta para o melhor entendimento da epidemiologia do VBIg em Minas Gerais e no Brasil.

Estudos mais amplos de seqüenciamento de amostras do VBIg isoladas no Brasil devem ser

efetuados para verificar a existência de diferenças genômicas em genes mais conservados que a glicoproteína da espícula. Isto pode ser muito interessante no atual momento em que vacinas contra o VBIg vêm sendo colocadas no mercado. Estas vacinas baseiam-se em amostras virais isoladas em outras partes do mundo, não havendo nenhuma garantia de proteção em relação às amostras virais presentemente encontradas no Brasil. As análises de isolados de campo de galinhas com diferentes histórias vacinais podem ser utilizadas para elucidar o papel das amostras vacinais na evolução do VBIg.

Apesar dos intensos estudos sobre o VBIg, ainda persistem demandas por pesquisas básicas que possam fornecer subsídios para o conhecimento deste vírus, sua biologia e relação com o hospedeiro na natureza. Estudos *in vitro* e *in vivo* de amostras geneticamente caracterizadas são necessários para a melhor compreensão da relação genótipo e fenótipo viral e hospedeiro.

O aparecimento e disseminação de amostras variantes importantes economicamente têm mostrado a necessidade de conhecimento mais aprofundado da imunopatogênese da doença e a necessidade de nos prepararmos para a emergência de variantes com manifestações clínicas e tropismos teciduais incomuns.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, J. T. **Identificação de isolados brasileiros do vírus da bronquite infecciosa das galinhas com RT-PCR universal e análises por RFLP de parte do gene N.** Belo Horizonte: Escola de Veterinária da UFMG, 2000, 51p. (Tese, Mestrado).
- 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, n.4, p. 817-836, 1996.
- ALBASSAM, M. A., WINTERFIELD, R. W., THACKER, H. L. Comparison of the nephropathogenicity of four strains of infectious bronchitis virus. **Avian Dis.**, v. 30, n. 3, p. 468-476, 1986.
- ALEXANDER, D. J., CHETTLE, N. J. Procedures for the haemagglutination and haemagglutination-inhibition tests for avian infectious bronchitis virus. **Avian Pathol.**, v. 6, n. 1, p. 9-17, 1977.
- ALEXANDER, D. J., GOUGH, R. E. A long-term study of the pathogenesis of infection of fowls with three strains of avian infectious bronchitis virus. **Res. Vet. Sci.**, v. 24, n. 2, p. 228-233, 1978.
- ALEXANDER, D. J., GOUGH, R. E. Isolation of avian infectious bronchitis virus from experimentally infected chickens. **Res. Vet. Sci.**, v. 23, n. 3, p. 344-347, 1977.
- ALEXANDER, D. J., GOUGH, R. E., PATTISON, M. A long-term study of the pathogenesis of infection of fowls with three strains of infectious bronchitis virus. **Res. Vet. Sci.**, v. 24, n. 2, p. 228-233, 1978.
- ALTSCHUL, S. F., MADDEN, T. L., SCHAEFFER, A. A. *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res.**, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.
- ANDREASEN, J. R., JACKWOOD, M. W., HILT, D. A. Polymerase chain reaction amplification of the genome of infectious bronchitis virus. **Avian Dis.**, v. 35, n. 1, p. 216-220, 1991.
- AVELLANEDA, G. E. Estructura del virus de bronquitis infecciosa. **Avic. Profesional**, v. 10, n. 1, p. 38-40, 1992.
- BALTIMORE, D. RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. **Nature**, v. 226, n. 5252, p. 1209-1211, 1970.
- BANNER, L. R., KECK, J. G., LAI, M. M. C. A clustering of RNA recombination sites adjacent to a hypervariable region of the peplomer gene of murine coronavirus. **Virology**, v. 175, n. 2, p. 548-555, 1990.
- BEACH, J. R., SCHALM, O. W. A filterable virus, distinct from that of laryngotracheitis, the cause of a respiratory disease of chicks. **Poult. Sci.**, v. 15, n. 3, p. 199-206, 1936.
- BEARDSLEY, A. M., GOWANS, E. J., BURRELL, C. J. *et al.* Enhanced amplification of hepatitis C virus (HCV) cDNA by PCR: detection of HCV RNA in archival sera. **J. Clin. Microbiol.**, v. 34, n.6, p. 1581-1582, 1996.
- BELAK, S., BALLAGI-PORDANY, A. Application of the polymerase chain reaction (PCR) in veterinary diagnostic virology. **Vet. Res. Commun.**, v. 17, n. 1, p. 55-72, 1993.
- BELAK, S., BALLAGI-PORDANY, A., ROS BASCUÑANA, C. Aplicacion de la reaccion en cadena por la polimerasa (PCR) para el diagnostico en virologia veterinaria. **Investig. Agrar. Prod. Sanid. Anim.**, v. 9, n. 2, p.147-169, 1994.
- BINGHAM, R. W. The polypeptide composition of avian infectious bronchitis virus. **Arch. Virol.**, v. 49, n. 2/3, p. 207-216, 1975.

- BINNS, M. M., BOURSNELL, M. E. G., CAVANAGH, D. *et al.* Cloning and sequencing of the gene encoding the spike protein of the coronavirus IBV. *J. Gen. Virol.*, v. 66, n. 4, p. 719-726, 1985.
- BINNS, M. M., BOURSNELL, M. E. G., TOMLEY, F. M. *et al.* Comparison of the spike sequences of coronavirus IBV strains M 41 and 6/82 with that of IBV Beaudette. *J. Gen. Virol.*, v. 67, n. 12, p. 2825-2831, 1986.
- BOLEDA, M. D., BRIONES, P., FARRÉS, J., TYFIELD, L., PI, R. Experimental design: a useful tool for PCR optimization. *Biotechniques.*, v. 21, n. 1, p. 134-140, 1996.
- BOS, E. C.W., LUYTJES, W., VAN DER MEULEN, H. KOERTEN, H. K., SPAAN, W. J. M. The production of recombinant infectious DI-particles of a murine *Coronavirus* in the absence of helper virus. *Virology*, v. 218, n. 2, p. 52-60, 1996.
- BOTSTEIN, D., WHITE, R. L., SKOLNICK, M. *et al.* Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Human. Genet.*, v. 32, n. 3, p. 314-331, 1980.
- BOURHY, H., KISSI, B., TORDO, N. *et al.* Molecular epidemiological tools and phylogenetic analysis of bacteria and viruses with special emphasis on Lyssaviruses. *Prev. Vet. Med.*, v. 25, n. 2, p. 161-181, 1995.
- 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.
- BOURSNELL, M. E. G., BROWN, T. D. K., BINNS, M. M. Sequence of the membrane protein gene for avian coronavirus IBV. *Virus Res.*, v. 1, p. 303-313, 1984.
- 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. Virology*, v. 68, n. 1, p. 57-77, 1987.
- BOX, P. G., HOLMES, H. C., FINNEY, P. M. *et al.* Infectious bronchitis in laying hens: the relationship between haemagglutination inhibition antibody levels and resistance to experimental challenge. *Avian Pathol.*, v. 17, n. 2, p. 349-361, 1988.
- BRESLIN, J. J., SMITH, L. G., FULLER, F. J., GUY, J. S. Sequence analysis of the matrix/nucleocapsid gene region of turkey coronavirus. *Intervirology*, v. 42, n. 1, p. 22-29, 1999.
- BRL, **Instruction Manual Gibco BRL, SuperScript™ Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis**, Life Technologies. CAT. N. 18089-011, 1999, 33p.
- BROWN, A. J., BRACEWELL, C. D. Application of the haemagglutination inhibition test to typing of infectious bronchitis virus. *Vet. Rec.*, v. 116, n. 1, p. 47-48, 1985.
- 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, n. 8, p. 1437-1442, 1984.
- BROWN, T. P., GLISSON, J. R., ROSALES, G. *et al.* Studies of avian urolithiasis associated with an infectious bronchitis virus. *Avian Dis.*, v. 31, n. 3, p. 629-636, 1987.
- BUSHNELL, L. D., BRANDLY, C. A. Laringotracheitis in chicks. *Poult. Sci.*, v. 12, n. 1, p. 12-60, 1933.
- BUTCHER, G., GELB, J., COLLISON, E. Comparisons of the genomic RNA of Arkansas DPI embryonic passages 10 and 100, Australian T, Massachusetts 41 strains of infectious bronchitis virus. *Avian Dis.*, v. 34, p. 253-259, 1990.
- CALLISSON, S. A., JACKWOOD, M. W., HILT, D. A. Infectious bronchitis virus S2 gene sequence variability may affect S1 subunit specific antibody binding. *Virus Genes*, v. 19, n. 2, p. 143-151, 1999.
- CAPUA, I., GOUGH, R. E., MANCINI, M. *et al.* A "novel" infectious bronchitis strain infecting broiler chickens in Italy. *J. Vet. Med. B*, v. 41, n. 2, p. 83-89, 1994.

- CAPUA, I., MINTA, Z., KARPINSKA, E. *et al.* Co-circulation of four types of infectious bronchitis virus (793/B, 624/I, B 1648 and Massachusetts). *Avian Pathol.*, v. 28, n. 6, p. 587-592, 1999.
- 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.** Conferência APINCO 1997 de Ciência e Tecnologia Avícolas, São Paulo. *In: Anais...* São Paulo, p. 54, 1997.
- CARGILL, P. Contemporacy European infectious bronchitis variants. *World Poult.*, v. 14, n. 2, p. 52-53, 1998.
- CASE, J. T., SVERLOW, K. W., REYNOLDS, B. J. A novel protein polymorphism differentiates the California serotype of infectious bronchitis virus from other serotypes common to California. *J. Vet. Diagn. Invest.* v. 9, p. 149-155, 1997.
- CAVANAGH, D. Advances in avian diagnostic technology. Proceedings of the Xth World Veterinary Poultry Association Congress, Sydney, 1993, p. 57-70.
- CAVANAGH, D. *Coronavirus IBV: further evidence that the surface projections are associated with two glycopolypeptides.* *J. Gen. Virol.*, v. 64, n. 8, p. 1787-1791, 1983.
- CAVANAGH, D. Structural polipeptides of *Coronavirus IBV.* *J. Gen. Virol.*, v. 53, n. 1, p. 93-103, 1981.
- CAVANAGH, D. **The *Coronavirus* surface glycoprotein.** *In: Siddell, S. G. The Coronaviridae*, 114, New York, Plenum Press, 1995.
- CAVANAGH, D., DAVIS, P. J. *Coronavirus IBV: removal of spike glycopolypeptide S1 by urea abolishes infectivity and haemagglutination but not attachment to cells.* *J. Gen. Virol.*, v. 67, n. 7, p. 1443-1448, 1986.
- CAVANAGH, D., DAVIS, P. J. Evolution of avian coronavirus IBV: sequence of the matrix glycoprotein gene and intergenic regions of several serotypes. *J. Gen. Virol.*, v. 69, n. 3, p. 621-629, 1988.
- 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, n. 4, p. 471-476, 1992.
- CAVANAGH, D., DAVIS, P. J., COOK, J. *et al.* Molecular basis of the variation exhibited by avian infectious bronchitis coronavirus (IBV). *In: D. CAVANAGH and T. D. K. BROWN (Eds), Coronaviruses and their diseases*, p. 369-372, 1991.
- CAVANAGH, D., DAVIS, P. J., COOK, J. K. A. *et al.* Location of the amino acid differences in the S1 spike glycoprotein subunit of closely related serotypes of infectious bronchitis virus. *Avian Pathol.*, v. 21, n. 1, p. 33-43, 1992.
- CAVANAGH, D., DAVIS, P. J., DARBYSHIRE, J. H. *et al.* *Coronavirus IBV: virus retaining spike glycopolypeptide S2 but not S1 is unable to induce virus-neutralizing or haemagglutination-inhibiting antibody, or induce chicken tracheal protection.* *J. Gen. Virol.*, v. 67, n. 7, p. 1435-1442, 1986.
- CAVANAGH, D., DAVIS, P. J., MOCKETT, A.P. Amino acids within hypervariable region 1 of avian *Coronavirus IBV* (Massachusetts serotype) spike glycoprotein are associated with neutralization epitopes. *Virus Res.*, v. 11, p. 141-150, 1988.
- CAVANAGH, D., ELLIS, M. M., COOK, J. K. A. Relationship between sequence variation in the S1 spike protein of infectious bronchitis virus and the extent of cross-protection in vivo. *Avian Pathol.*, v. 26, n. 1, p. 63-74, 1997.
- 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.
- CAVANAGH, D., MAWDITT, K., BRITTON, P. *et al.* Longitudinal field studies of infectious bronchitis virus and avian pneumovirus in broilers using type-specific polymerase chain reactions. *Avian Pathol.*, v. 28, p. 593-605, 1999.
- CAVANAGH, D., NAQI, S. A. **Infectious bronchitis.** *In: CALNEK, B. W. et al., eds.*

Diseases of poultry, 13^o ed. Ames: Iowa State University Press, USA, 1080 p., cap. 17, p. 511-526, 1997.

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, n. 2, p. 269-283, 1996.

CHOMCZYNSKI, 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.

CISLAGHI, G., MARTINO, B. A., ZANELLA, A. Bronchite infettiva aviare: persistenza nel nostro paese del virus nefropatogeno sierotipo AZ 23/74. Proceedings XXXV Convegno Società Italiana di Patologia Aviaria, Forlì. *La Selezione Veterinaria*, 8-9, 597-605, 1997.

CLEWLEY, J. P., MORSE, J., AVERY, R. J. *et al* Oligonucleotide fingerprinting of the RNA of different strains of infectious bronchitis virus. *Infect. Immun.*, v. 32, n. 3, p. 1227-1233, 1981.

COLLINS, A.R., KNOBLER, R. L., POWELL, H., BUCHMEIER, M. J. Monoclonal antibodies to murine hepatitis virus-4 (strain JHM) define the viral glycoprotein responsible for attachment and cell-cell fusion. *Virology*, v. 119, n. 2, 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.

COOK, J. K. A. Bronquite infecciosa aviária: situação mundial e distribuição de sorotipos. *Simpósio sobre Sanidade Avícola*, p. 13-27, 1998.

COOK, J. K. A. Isolation of a new serotype of infectious bronchitis-like virus from chickens in England. *Vet. Rec.*, v. 112, n. 5, p. 104-105, 1983.

COOK, J. K. A. Recovery of infectious bronchitis virus from eggs and chicks produced

by experimentally inoculated hens. *J. Comp. Pathol.*, v. 81, p. 203-211, 1971.

COOK, J. K. A., BROWN, A. J., BRACEWELL, C. D. Comparison of the haemagglutination inhibition test and serum neutralisation test tracheal organ cultures of typing infectious bronchitis virus strains. *Avian Pathol.*, v. 16, n. 3, p. 505-511, 1987.

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

COOK, J. K., HUGGINS, M. B. Newly isolated serotypes of infectious bronchitis virus: their role in disease. *Avian Pathol.*, v. 15, n. 1, p. 129-138, 1986.

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, n. 4, p. 733-741, 1984.

COWEN, B. S., WIDEMAN Jr., R. F., BRAUNE, M. O. *et al*. An infectious bronchitis virus isolated from chickens experiencing a urolithiasis outbreak. I. *In vitro* characterization studies. *Avian Dis.*, v. 31, n. 4, p. 878-883, 1987.

COWEN, B.S., HITCHNER, S. B., UBERTINI, T. Characterization of a new infectious bronchitis virus isolate. II. Some chemical and physical properties of Clark 333. *Avian Dis.*, v. 15, n. 3, p. 527-532, 1971.

CRINION, R. A. P., HOFSTAD, M. S. Pathogenicity of four serotypes of avian infectious bronchitis virus for the oviduct of young chickens of various ages. *Avian Dis.*, v. 16, n. 2, p. 351-363, 1972.

CUMMING, R. B. Infectious avian nephrosis (uraemia) in Australia. *Aust. Vet. J.*, v. 39, n. 4, p. 145-147, 1963.

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

- CUNNINGHAM, C. H. Immunologic methods in avian research: neutralization test. *Avian Dis.*, v. 17, n. 1, p. 227-235, 1977.
- CUYPERS, H. T. M., BRESTERS, D., WINKEL, I. N., REESINK, H. W., WEINER, A. J., HOUGHTON, M., VAN DER POEL, C. L., LELIE, P. N. Storage conditions of blood samples and primer selection affect the yield of cDNA polymerase chain reaction products of hepatitis C virus. *J. Clin. Microbiol.*, v. 30, n. 12, p. 3220-3224, 1992.
- DALES, S. Early events in cell-animal virus interactions. *Bacteriol. Rev.*, v. 37, p. 103-135, 1973.
- DARBYSHIRE, J. H. Assessment of cross-immunity in chickens to strains of infectious bronchitis virus using tracheal organ cultures. *Avian Pathol.*, v. 9, p. 179-183, 1979.
- DARBYSHIRE, J. K., ROWELL, J. G., COOK, J. K. A. *et al.* Taxonomic studies on strains of avian infectious bronchitis virus using neutralisation tests in tracheal organ cultures. *Arch. Virol.*, v. 61, n. 3, p. 227-238, 1979.
- DAVELAAR, F. G., KOUWVHOVEN, B., BURGER, A. G. Occurrence and significance of infectious bronchitis virus variant strains in egg and broiler production in the Netherlands. *Vet. Q.*, v. 6, n. 3, p. 114-120, 1984.
- DAVIES, H. A., MACNAUGHTON, M.R. Comparison of the morphology of three coronaviruses. *Arch. Virol.*, v. 59, n. 1, p. 25-33, 1979.
- DEGROOT, R. J., LUYTES, W., HORZINEK, M. C. *et al.* Evidence for a coiled-coil structure in the spike protein of coronaviruses. *J. Mol. Biol.*, v. 196, n. 4, p. 963-966, 1987.
- DEGROOT, R. J., WAN LEEN, R. W., DALDERUP, M. J. M. *et al.* Stably expressed FIPV peplomer protein induces cell fusion and elicits neutralizing antibodies in mice. *Virology*, v. 171, n. 2, p. 493-502, 1989.
- DHINAKAR RAJ, 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, n.3, p. 481-501, 1996.
- DHINAKAR RAJ, G., JONES, R. C. Infectious bronchitis virus: immunopathogenesis of infection in the chicken. *Avian Pathol.*, v. 26, n. 4, p. 677-706, 1997.
- DI FÁBIO, J. **Bronquite infecciosa das galinhas: aspectos clínicos e controle da BIG no Brasil.** Conferência Apinco 1993 de Ciência e Tecnologia Avícolas, Santos - SP. *In: Anais... Santos*, p. 01 - 08, 1993.
- EL-HOUADFI, M. D., JONES, R. C., COOK, J. K. A. *et al.* The isolation and characterization of six avian infectious bronchitis viruses isolated in Morocco. *Avian Pathol.*, v. 15, n. 1, p. 93-105, 1986.
- EMBRAPA. **Centro Nacional de Pesquisa de Suínos e Aves (Concórdia, SC).** II Plano Diretor: Embrapa Suínos e Aves, 2000 - 2003. Concórdia, Embrapa Suínos e Aves, 2000.
- 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, 73p. (Tese, Mestrado).
- ESCORCIA, M., JACKWOOD, M. W., LUCIO, B. *et al.* Characterization of Mexican strains of avian infectious bronchitis isolated during 1997. *Avian Dis.*, v. 44, n. 4, p. 944-947, 2000.
- FACTA. Performance da avicultura supera maioria dos segmentos econômicos. *Avicult. C & T*, Ano 3, n. 16, p. 3, 1995.
- FALCONE, E., D'AMORE, E., TRANI, L. *et al.* Rapid diagnosis of avian infectious bronchitis virus by the polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods.*, v. 64, n. 2, p. 125-130, 1997.
- FENNER, F. J., GIBBS, E. P. J., MURPHY, F. A. *et al.*, 1993, *Vet. Virol.*, 2nd ed. Academic Press, San Diego, CA.
- GELB Jr., J. **Infectious bronchitis.** *In: A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens.* 3rd ed. PURCHASE, H.G., ARP, L.H., DOMERMUTH, C.H., PEARSON, J.E. (ed). Americam

Association of Avian Pathologists, Kenneth Square, Pa. p. 124-127, 1989.

GELB Jr., J., WOLFF, J.B., MORAN, C. A. Variant serotypes of infectious bronchitis virus isolated from commercial layer and broiler chickens. *Avian Dis.*, v. 35, n. 1, p. 82-87, 1991.

GELB, J. Variant IBV serotypes in commercial chickens in the United States and Canada and approaches to their control. *Int. Symp. Infect. Bronchitis*, v. 2, p. 206-216, 1991.

GOUGH, R. E., COX, W. G., GUTIERREZ, E. *et al.* Isolation of "variant" strains of infectious bronchitis virus from vaccinated chickens in Great Britain. *Vet. Rec.*, v. 139, n. 23, p. 552, 1996.

GOUGH, R. E., RANDALL, C. J. DAGLESS, M. *et al.* A "new" strain of infectious bronchitis virus infecting domestic fowl in Great Britain. *Vet. Rec.*, v. 130, n. 22, p. 493-494, 1992.

GOUGH, R.E., ALEXANDER, D.J. Comparison of serological tests for the measurement of the primary immune response to avian infectious bronchitis virus vaccines. *Vet. Microb.*, v. 2, n. 4, p. 289-301, 1977.

GUY, J.S. Turkey *Coronavirus* is more closely related to avian infectious bronchitis virus than to mammalian *Coronavirus* es: a review. *Avian Pathol.*, v. 29, n. 2, p. 207-212, 2000.

GUY, J.S., BARNES, H.J., SMITH, L.G., BRESLIN, J. Antigenic characterization of a turkey *Coronavirus* identified in poult enteritis and mortality syndrome-affected turkeys. *Avian Dis.*, v. 41, n. 3, p. 583-590, 1997.

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 an immunohistochemical technique. *Avian Pathol.*, v. 28, n. 4, p. 327-335, 1999.

HIDALGO, H. Influencia de aspectos sanitarios sobre los costes de producción de huevos de consumo. *Selecciones Avícolas*, v. 39, n. 9, p. 538-542, 1997.

HIPÓLITO, O. Estudo de duas amostras de vírus isoladas de casos de aves com a síndrome nefrite-nefrose. *Ciência & Cultura*, v. 25, n. 6, p. 609, 1973.

HIPÓLITO, O. Spectrophotometric and serumneutralization studies of sera from chickens exposed to infectious bronchitis virus. *Arquivo da Escola de Veterinária*, v. 10, p. 179-224, 1957.

HOFSTAD, M. S. Avian infectious bronchitis. *In: Diseases of poultry*, 8th ed. HOFSTAD, M. S., BARNES, H. J., CALNEK, B. W., REID, W. M., YODER Jr., H. W. eds. Iowa State University Press, Ames, Iowa. p. 429-443. 1984.

HOFSTAD, M. S. Immune response to infectious bronchitis virus. *Am. J. Vet. Res.*, v. 36, n. 4, p. 520-521, 1975.

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

HOFSTAD, M.S. Cross-immunity in chickens using seven isolates of avian infectious bronchitis virus. *Avian Dis.*, v. 25, n. 3, p. 650-654, 1981.

HOLLAND, J., SPINDLER, K., HORODYSKI, F. *et al.* Rapid evolution of RNA genomes. *Science*, v. 215, n. 4539, p. 1577-1585, 1982.

HOLMES, K.V. Coronaviridae and their replication. *In: FIELDS, B.N (Ed.). Virology*, v. 1, p. 841-856. New York: Raven Press. 1990.

HOLMES, K.V., LAI, M.M.C. Coronaviridae: The viruses and their replication. *In: FIELD, B.N.*

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

HOPKINS, S.R. Serologic and immunologic properties of a recent isolate of infectious bronchitis virus *Avian Dis.*, v. 13, n. 2, p. 356-362, 1969.

IGNJATOVIC, J. & ASHTON, F. Detection and differentiation of avian infectious bronchitis

viruses using a monoclonal antibody-based ELISA. *Avian Pathol.*, v. 25, n. 4, p. 721-736, 1996.

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, n. 1-2, p. 117-134, 1994.

IGNJATOVIC, J., MCWATERS, 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, n. 12, p. 2915-2922, 1991.

IKUTA, N. <simbios@simbios.com.br>. RFLP. E-mail to SANTIAGO, S.L.T. <salettesantiago@hotmail.com>, 2000.

IKUTA, N. **Diagnóstico de doenças em aves através da biologia molecular. Conferência APINCO 1999 de Ciência e Tecnologia Avícola, Campinas.** In: Anais... Campinas, p. 103-114, 1999.

INNIS, M. A., GELFAND, D. H. **Optimization of PCR.** In: INNIS, M. A., GELFAND, D. H., SNINSKY, J. J., WHITE, T. J. (Eds.), *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications.* Academic Press, San Diego, CA, p. 1-12, 1990.

JACKWOOD, M. W. Identification of regions within S1 glycoprotein gene of IBV that define serotype. <http://www.poultryegg.org/research/PROJ_112.HTM>, 1997.

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, n. 2, 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, n. 1, p. 105-110, 1997.

JACKWOOD, M.W.<mjackwood@arches.uga.edu>. Infectious bronchitis virus. E-mail to SANTIAGO, S.L.T. <salettesantiago@hotmail.com>, 2000.

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, n. 2, p. 189-193, 1997.

JOHNSON, R. B., MOULTHROP, I. M., NEWMAN, J. A. *Avian Dis.*, v. 16, p. 828-832, 1972.

JOHNSON, R.B., MARQUARDT, W.W., NEWMAN, J.A. A new serotype of infectious bronchitis virus responsible for respiratory disease in Arkansas broiler flocks. *Avian Dis.*, v. 17, n. 3, p. 518-523, 1973.

JONES, R.C. Nephrosis in laying chickens caused by Massachusetts-type infectious bronchitis virus. *Vet. Rec.*, v. 95, n. 14, p. 319, 1974.

JULIAN, R.J., WILLIS, N.G. The nephrosis-nephritis syndrome in chickens caused by a Holte strain of infectious bronchitis virus. *Can. Vet. J.*, v. 19, p. 18-19, 1969.

JUNGHERR, E. L., CHOMIAK, T. W., LUGINBUHL, R. E. **Immunologic differences in strains of infectious bronchitis virus.** Proceedings of the 60th Annual Meeting of the United States Livestock Sanitary Association. Chicago, Illinois, p. 203-209, 1956.

KANT, A., KOCH, G., van ROOZELAAR, D. J. *et al.* Location of antigenic sites defined by neutralizing monoclonal antibodies on the S1 avian infectious bronchitis virus glycopolyptides. *J. Gen. Virol.*, v. 73, n. 3, p. 591-596, 1992.

KARACA, K., NAQI, S. A., PALUKAITIS, P. *et al.* Serological and molecular characterization of three enteric isolates of infectious bronchitis virus in chickens. *Avian Dis.*, v. 34, n. 4, p. 899-904, 1990.

- KEELER Jr., C.I., REED, K.I., NIX, W.A., GELB Jr., J. Serotype identification of avian infectious bronchitis virus by RT-PCR of the peplomer (S-1) gene. *Avian Dis.*, v. 42, n. 2, p. 275-284, 1998.
- KING, D. J. Identification of recent infectious bronchitis virus isolates that are serologically different from current vaccine strains. *Avian Dis.*, v. 32, n. 2, p. 362-364, 1988.
- KING, D. J., HOPKINS, S. R. Rapid serotyping of infectious bronchitis virus isolates with the hemagglutination-inhibition test. *Avian Dis.*, v. 28, n. 3, p. 727-733, 1984.
- KING, D.J., CAVANAGH, D. Infectious bronchitis. In: CALNEK, B.W., BARNES, H.J., BEARD, C.W., REID, W.M., YODER, H.W. (Ed.), *Diseases of Poultry*. Iowa: Iowa State University Press, p. 471-484, 1991.
- KING, D.J., HOPKINS, S.R. Evaluation of the haemagglutination-inhibition test for measuring the response of chickens to avian infectious bronchitis virus vaccination. *Avian Dis.*, v. 27, n. 1, p. 100-112, 1983.
- KNIFE, D.M., HOWLY, P.M. (Ed.) *Fundamental Virology*. v. 1, 3 ed, p. 1075-1093. Philadelphia, PA: Lippincott-Raven Publishers, 1996.
- 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, n. 9, p. 1929-1935, 1990.
- KOTTIER, S. A., CAVANAGH, D., BRITTON, P. Experimental evidence of recombination in coronavirus infectious bronchitis virus. *Virology*, v. 213, n. 2, p. 569-580, 1995.
- KUBO, H., YAMADA, Y.K., TAGUCHI, F. Localization of neutralizing epitopes and the receptor-binding site within the amino-terminal 330 amino acids of the murine *Coronavirus* spike protein. *J. Virol.*, v. 68, n. 9, p. 5403-5410, 1994.
- KUSTERS, J. G., JAGER, E. J., NIESTERS, H. G. M. *et al.* Sequence evidence for RNA recombination in field isolates of avian coronavirus infectious bronchitis virus. *Vaccine*, v. 8, p. 605-608, 1990.
- KUSTERS, J. G., NIESTERS, G. M., BLEUMINK-PLUYM, N. M. C. *et al.* Molecular epidemiology of infectious bronchitis virus in the Netherlands. *J. Gen. Virol.*, v. 68, p. 343-352, 1987.
- KUSTERS, J. G., NIESTERS, H. G. M., LENSTRA, J. A. *et al.* Phylogeny of antigenic variants of avian *Coronavirus* IBV. *Virology*, v. 169, n. 1, p. 217-221, 1989.
- KWON, H. M., JACKWOOD, M. W., GELB Jr., J. Differentiation of infectious bronchitis virus serotypes using polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. *Avian Dis.*, v. 37, n. 1, p. 194-202, 1993.
- LAI, M. M. C. RNA recombination in animal and plant viruses. *Microbiol. Rev.*, v. 56, n. 1, p. 61-79, 1992.
- LAI, M. M. C., CAVANAGH, D. The molecular biology of *Coronavirus* es. *Adv. Virus Res.*, v. 48, p. 1-100, 1997.
- LAI, M. *Coronavirus*: organization, replication and expression. *Annu. Rev. Microbiol.*, v. 44, n. 303, 1990.
- LAMBRECHTS, C., PENSART, M., DUCATELLE, R. Challenge experiments to evaluate cross-protection induced at the trachea and kidney level by vaccine strains and Belgian nephropathogenic isolates of avian infectious bronchitis virus. *Avian Pathol.*, v. 22, n. 3, p. 577-590, 1993.
- LASHGARI, M. S., NEWMAN, J. A. Serological comparison and antigenic relationships of seven serotypes of infectious bronchitis virus using the haemagglutination-inhibition test. *Avian Dis.*, v. 28, n. 2, p. 435-443, 1984.
- LE GALL, A., LEGEAY, O., BOURHY, H. *et al.* Molecular variation in the nucleoprotein gene (ORF7) of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Virus Res.*, v. 54, p. 9-21, 1998.
- LEE, C. W., JACKWOOD, M. W. Evidence of genetic diversity generated by recombination

- among avian coronavirus IBV. *Arch. Virol.*, v. 145, n. 10, p. 2135-2148, 2000.
- LENSTRA, J. A., KUSTERS, J. G., KOCH, G. *et al.* Antigenicity of the peplomer protein of infectious bronchitis virus. *Mol. Immunol.*, v. 26, n. 1, p.7-15, 1989.
- 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, n. 1, 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, n. 2, 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, n. 2, p. 911-917, 1991.
- LUCIO, B., FABRICANT, J. Tissue tropism of three cloacal isolates and Massachusetts strain of infectious bronchitis virus. *Avian Dis.*, v. 34, n. 4, p. 865-870, 1990.
- 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). Conferência APINCO 1998 de Ciência e Tecnologia Avícola, Campinas. *In: Trabalhos de pesquisa Campinas*, p. 50, 1998.
- MAKINO, S., KECK, J. G., STOHLMAN, S. A. *et al.* High-frequency RNA recombination of murine coronaviruses. *J. Virol.*, v. 57, p. 729-737, 1986.
- MARTINS, N. R. S. Alguns aspectos da etiopatogenia de bronquite infecciosa. Conferência APINCO 1992 de Ciência Tecnologia Avícolas, Campinas. *In: Anais... Campinas*, p. 145 - 150, 1992.
- MAXAM, A. M., GILBERT, W. A new method for sequencing DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 74, n. 2, p. 560-564, 1977.
- 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.
- MOORE, K. M., BENNETT, J. D., SEAL, B. S. *et al.* Sequence comparison of avian infectious bronchitis virus S1 glycoproteins of the Florida serotype and five variant isolates from Georgia and California. *Virus Genes*, v. 17, n. 1, p. 63-83, 1998.
- MORA, E. C. Virus infections of cultured macrophages and lymphocytes. *Poult. Sci.*, v. 45, n. 5, p. 1106-1107, 1966.
- MOVING, V., CZIFRA, G., RENSTRÖM, L. A monoclonal antibody blocking ELISA for detection of IBV antibodies en fowl. *Adv. Exp. Med. Biol.*, v. 440, p. 495-500, 1998.
- MUNEER, M. A., NEWMAN, J. A., SIVANANDAN, V. *et al.* A dot-immunobinding assay for infectious bronchitis virus. *Avian Dis.*, v. 32, n. 1, p. 137-139, 1988.
- MUNEER, M.A., NEWMAN, J.A., HALVORSON, D.A. *et al.* Effects of avian infectious bronchitis virus (Arkansas strain) on vaccinated laying chickens. *Avian Dis.*, v. 31, n. 4, p. 820-828, 1987.
- MURPHY, F. A., FAUQUET, C. M., BISHOP, D. H. L. *et al.* Virus taxonomy. Classification and nomenclature of viruses. *Arch. Virol. Supplem.*, v. 10, p. 268-274, 1995.
- NAKAMURA, K., COOK, J. K. A., OTSUKI, K. *et al.* Comparative study of respiratory lesions in two chicken line of different susceptibility infected with infectious bronchitis virus-histology, ultrastructure and immunochemistry. *Avian Pathol.*, v. 20, n. 1, p. 241-257, 1991.
- NAQI, A. S., KARAKA, J., BAUMAN, B. A monoclonal antibody-based antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay for identification of infectious bronchitis virus

serotypes. *Avian Pathol.*, v. 22, n. 3, 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. Methods*, v. 70, n. 1, p. 37-44, 1998.

NIESTERS, H. G. M., LENSTRA, J. A., SPAAN, W. J. M. *et al.* The peplomer protein sequence of the M41 strain of coronavirus IBV and its comparison with Beaudette strains. *Virus Res.*, v. 5, p. 253-263, 1986.

NIESTERS, H. G., BLEUMINK-PLUYM, N. M. C., OSTERHAUS, A. D. M. E. *et al.* Epitopes on the peplomer protein of infectious bronchitis virus strain M41 as defined by monoclonal antibodies. *Virology*, v. 161, n. 2, p. 511-519, 1987.

NIX, W. A., TROEBER, D. S., KINGHAM, B. F. *et al.* Emergence of subtype strains of the Arkansas serotype of infectious bronchitis virus in Delmarva broiler chickens. *Avian Dis.*, v. 44, n. 3, p. 568-581, 2000.

OKAYAMA, H., KAWAICHI, M., BROWNSTEIN, M. *et al.* High-efficiency cloning of full-length cDNA; construction and screening of cDNA expression libraries for mammalian cells. *Methods Enzymol.*, v. 54, p. 3-28, 1987.

OSTE, C. Polymerase chain reactions. *Biotechniques*, v. 6, p. 162-167, 1988.

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).

PERMAUL, K., PILLARY, D., PILLARY, B. Random-amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis shows intraspecific differences among *Xanthomonas albilineans* strains. *Lett. Appl. Microbiol.*, v. 23, n. 5, p. 307-311, 1996.

PERROTTA, C., FURTEK, C., WILSON, R. A., COWEN, B. S., ECKROADE, R.J. A standardized enzyme-linked immunosorbent assay for infectious bronchitis virus: comparison with haemagglutination-inhibition and virus-

neutralization. Assays for measuring protective antibody levels in chickens. *Avian Dis.*, v. 32, n.3, p. 451-460, 1988.

PURCELL, D.A., CLARKE, J.K. The replications of infectious bronchitis virus in fowl trachea. *Arch. Ges. Virusforsch.*, v. 39, p. 248-256, 1972.

PURCHASE, H.G. Practical application of nucleic acid techniques to avian disease problems. *Avian Dis.*, v. 33, n. 4, p. 609-614, 1989.

QUIROZ, M.A. Actualidades de la bronquitis infecciosa. *Industria Avícola*, v. 46, n. 3, p. 36-40, 1999.

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).** (Tese Mestrado), 74p., Belo Horizonte: UFMG – Escola de Veterinária, Brasil, 1983.

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.

ROHLF, F. J. NT-SYS numerical taxonomy and multivariate analysis system – version 1.60. Exeter Software, New York, 1990.

ROTTIER, P. J. M., WELLING, G. W., WELLING-WESTER, S. *et al.* Predicted membrane topology of the *Coronavirus* protein E1. *Biochemistry*, v. 25, n. 6, p. 1335-1339, 1986.

SAIKI, R. K. **The design and optimization of the PCR.** *PCR Technology – Principles and Applications for DNA Amplification*, p. 7-16, 1989.

SAIKI, R. K., GELFAND, D. H., STOFFEL, S., SCHARF, S. J., HIGUCHI, R., HORN, G. T., MULLIS, K. B., ERLICH, H.A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, v. 239, n. 4839, p. 487-491, 1988.

SAIKI, R. K., SCHARF, S., FALOONA, F., MULLIS, K., HORN, G., ERLICH, H. A., AMHEIM,

- N. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, v. 230, n. 4732, p. 1350-1354, 1985.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A laboratory manual**. Cold Spring Harbor Laboratory. Second edition, 1989.
- SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.
- SANGUINETTI, C. J., DIAS NETO, E., SIMPSON, A. J. G. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques*, n. 17, p. 915-918, 1994.
- SANTOS, F. R., PENNA, S. D. J., EPPLER, J. T. Genetic and populational study os na Y-linked tetranucleotide repeat DNA polymorphism. *Human Genet.*, v. 90, p. 655-656, 1993.
- SAPATS, S. I., ASHTON, F., WRIGHT, P. J. *et al.* Sequence analysis of the S1 glycoprotein of infectious bronchitis viruses: identification of a novel genotypic group in Australia. *J. Gen. Virol.*, v. 77, n. 3, p. 413-418, 1996.
- SCHALK, A. F., HAWN, M. C. An apparently new respiratory disease of baby chick. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 78, p. 413-422, 1931.
- SEO, S. H., COLLISON, 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.
- SHAW, K., BRITTON, P. CAVANAGH, D. Sequence of the spike protein of the Belgian B1648 isolate of nephropathogenic infectious bronchitis virus. *Avian Pathol.*, v. 25, n. 3, p. 607-611, 1996.
- SIDDELL, S. G., ANDERSON, R., CAVANAGH, D. *et al.* Coronaviridae. *Intervirology*, v. 20, n. 4, p. 181-189, 1983.
- SILVEIRA, R. M., MARQUES, E. K. **Otimização da detecção do vírus da bronquite infecciosa por RT-PCR. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIAS AVÍCOLA**, 1995. Anais..., p. 177-178, 1995.
- SMITH, A. R., BOURSNELL, M. E. G., BINNS, M. M. *et al.* Identification of a new membrane-associated polypeptide specified by the coronavirus infectious bronchitis virus. *J. Gen. Virol.*, v. 71, n. 1, p. 3-11, 1990.
- SNEED, L. W., BUTCHER, G. D., PARR, R. *et al.* Comparison of the structural proteins of avian infectious bronchitis virus as determined by western blot analysis. *Virol. Immunol.*, v. 2, p. 221-227, 1989.
- 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, n. 4, 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.** (Tese Mestrado), 75p. Belo Horizonte: UFMG – Escola de Veterinária, Brasil, 1999.
- SPAAN, W., CAVANAGH, D., HORZINEK, M. C. Coronavirus, structure and genomic expression. *J. Gen. Virol.*, v. 69, n. 12, p. 2939-2952, 1988.
- STEPHENSEN, C. B., CASEBOLT, D. B., GANGOPADHYAY, N.N. Phylogenetic analysis of a highly conserved region of the polymerase gene from eleven *Coronavirus* es and development of a consensus polymerase chain reaction assay. *Virus Res.*, v. 60, p. 181-189, 1999.
- STERN, D. F., KENNEDY, S. I. T. *Coronavirus* multiplication strategy. I. Identification and characterization of virus-specified RNA. *J. Virol.*, v. 34, n. 3, p. 665-674, 1980.
- 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.
- STERN, D. F., BURGESS, L., SEFTON, B.M. Structural analysis of virion proteins of the avian *Coronavirus* infectious bronchitis virus. *J. Virol.*, v. 42, n. 1, p. 208-219, 1982.

- STURMAN, L. S., HOLMES, K. V. The molecular biology of *Coronavirus* es. **Adv. Virus Res.**, v. 29, n. 35, 1983.
- SUFOU, S., SATO, 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.
- UPPAL, P. K., CHU, H.P. An electron-microscope study of the trachea of the fowl infected with avian infectious bronchitis virus. **J. Med. Microbiol.**, v. 3, n. 4, p. 643-647, 1970.
- VAN DE PEER, Y., DE WACHTER, R. TREECON for windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the microsoft windows environment. **Comput. Applic. Biosci.**, v. 10, p. 569-570, 1994.
- VAN DER SLUIS, W., HUNTON, P. Global disease Update: More diseases troubling poultry world. **World Poult.**, v. 16, n. 7, p. 26-30, 2000.
- VAN ROEKEL, F. R., CLARKE, M. K., BULLIS, K. L. *et al.* Infectious bronchitis. **Am. J. Vet. Res.**, v. 12, n. 42, p. 140-146, 1951.
- WANG, C. H., HSIEH, M. C., CHANG, P. C. Isolation, pathogenicity, and HI20 protection of infectious bronchitis viruses isolated in Taiwan. **Avian Dis.**, v. 40, n. 3, p. 620-625, 1996.
- WANG, C. H., HUANG, Y. C. Relationship between serotypes and genotypes based on the hypervariable region of the S1 gene of infectious bronchitis virus. **Arch. Virol.**, v. 145, n. 2, p. 291-300, 2000.
- WANG, C. H., TSAI, C. T. Genetic grouping for the isolates of avian infectious bronchitis virus in Taiwan. **Arch. Virol.**, v. 141, n. 9, p. 1677-1688, 1996.
- WANG, C., MIGUEL, B., AUSTIN, F. W. *et al.* Comparison of the immunofluorescent assay and reverse transcription-polymerase chain reaction to detect and type infectious bronchitis virus. **Avian Dis.**, v. 43, n. 3, p. 590-596, 1999.
- WANG, L., JUNKER, D., COLLISON, E. W. Evidence of natural recombination within the S1 gene of infectious bronchitis virus. **Virology**, v. 192, p. 710-716, 1993.
- WANG, L., JUNKER, D., HOCK, L., EBIARY, E., COLLINSSON, E. W. Evolutionary implications of genetic variation in the S1 gene of infectious bronchitis virus. **Virus Res.**, v. 34, p. 327-338, 1994.
- WANG, L., PARR, L. R., KING, D. J. *et al.* A highly conserved epitope on the spike protein of infectious bronchitis virus. **Arch. Virol.**, v. 140, n. 12, p. 2201-2213, 1995.
- WANG, X., KHAN, M. I. Molecular characterization of an infectious bronchitis virus strain isolated from an outbreak in vaccinated layers. **Avian Dis.**, v. 44, n. 4, p. 1000-1006, 2000.
- WEIGEL, R. M., SCHERBA, G. Quantitative assessment of genomic similarity from restriction fragment patterns. **Prev. Vet. Med.**, v. 32, n. 1-2, p. 95-110, 1997.
- WENTZ, I. Bronquite infecciosa – que cepa vacinal usar? Conferência APINCO 1988 de Ciência e Tecnologias Avícolas, Campinas. In: Anais... Campinas, p. 165-168, 1988.
- WILCOX, G. E., NANDAPALAN, N., FLOWER, R. L. P., FRY-SMITH, D. Comparison of a microneutralisation test with ELISA and precipitin test for detection of antibodies to infectious bronchitis virus in chickens. **Aust. Vet. J.**, v. 60, n. 4, p. 119-122, 1983.
- WILLIAMS, A. K., WANG, L., SNEED, L.W. *et al.* Comparative analyses on the nucleocapsid genes of several strains of infectious bronchitis virus and other coronaviruses. **Virus Res.**, v. 25, n. 213-222, 1992.
- 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.
- WILLIAMS, J. G. K., KUBELICK, A. R., LIVAK, K. J. *et al.* DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Res.**, v. 18, n. 22, p. 6531-6535, 1990.

WINTERFIELD, R. W., ALBASSAM, M. A. Nephropathogenicity of infectious bronchitis virus. *Poult. Sci.*, v. 63, n. 12, p. 2358-2363, 1984.

WINTERFIELD, R. W., HITCHNER, S. B. Etiology of an infectious nephritis-nephrosis syndromes of chickens. *J. Vet. Res.*, v. 23, n. 93, p. 1273-1279, 1962.

WINTERFIELD, R. W., HITCHNER, S. B., APPLETON, G. S. Immunological characteristics of a variant of infectious bronchitis virus isolated from chickens. *Avian Dis.*, v. 8, n.1, p. 40-47, 1964.

WYMAN, A. R., WHITE, R. A highly polymorphic locus in human DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 77, n. 11, p. 6754-6758, 1980.

YAGYU, K., OHTA, S. Detection of infectious bronchitis virus antigen from experimentally infected chickens by indirect immunofluorescent assay with monoclonal antibody. *Avian Dis.*, v. 34, p. 246-252, 1990.

YU, X., BI, W., WEISS, S. R. *et al.* Mouse hepatitis virus gene 5b protein is a new virion envelope protein. *Virology*, v. 202, n. 2, p. 1018-1023, 1994.

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